

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**EFEECTO DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN
"BRAF" Y DE LAS ALTERACIONES EPIGENÉTICAS
DE LOS GENES "P16" Y "HMLH1" EN EL CÁNCER
COLORRECTAL ESPORÁDICO : VALOR
PRONÓSTICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Silvia Veganzones de Castro

Bajo la dirección de los doctores

Eduardo Díaz-Rubio
María Luisa Maestro
Marta Vidaurreta

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**EFFECTO DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* Y DE
LAS ALTERACIONES EPIGENÉTICAS DE LOS GENES *P16*
Y *HMLH1* EN EL CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO.
VALOR PRONÓSTICO.**

SILVIA VEGANZONES DE CASTRO

Madrid 2013

**EFFECTO DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* Y DE LAS
ALTERACIONES EPIGENÉTICAS DE LOS GENES *P16* Y
HMLH1 EN EL CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO.
VALOR PRONÓSTICO.**

Silvia Vezanzones de Castro

Tesis Doctoral

Universidad Complutense Madrid

DIRECTORES

Prf. Eduardo Díaz-Rubio

Dra. M^a Luisa Maestro

Dra. Marta Vidaurreta

Catedrático Medicina UCM

Dra. Ciencias Biológicas

Dra. Ciencias Químicas

Jefe Servicio Oncología Médica

Facultativo Especialista

Hospital Clínico San Carlos.

Hospital Clínico San Carlos.

Hospital Clínico San Carlos.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

HOSPITAL CLINICO SAN CARLOS

Prof. **Eduardo Díaz-Rubio García**, Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid.

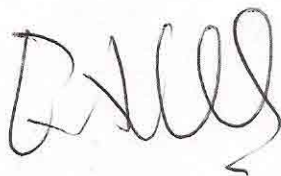
Dra. **Maria Luisa Maestro de las Casas**, Doctora en CC. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid.

Dra. **Marta Vidaurreta Lázaro**, Doctora en CC. Químicas por la Universidad Complutense de Madrid.

INFORMAN:

Que la tesis titulada: “Efecto de la mutación V600E del gen *BRAF* y de las alteraciones epigenéticas de los genes *P16* y *hMLH1* en el cáncer colorrectal esporádico. Valor pronóstico.”, de la que es autora Dña. **Silvia Vezanzones de Castro**, licenciada en CC. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentada a efectos de ser juzgada.

Madrid, a 10 de Febrero de 2013.



Fdo. Prof Díaz-Rubio



Fdo. Dra Maestro.



Fdo. Dra. Vidaurreta

A Diego

Agradecimientos

Han pasado nueve años ya desde aquel verano en que me enfundé por primera vez la bata blanca en el laboratorio coordinado por la Dra. Maestro hasta la finalización de este trabajo. Nueve años desde que Sara, mi compañera de facultad, me presentara en el laboratorio para que yo diera mis primeros pasos fuera de la facultad, de los profesores y de los libros. Nueve años aprendiendo día a día a poner en práctica lo estudiado en la facultad, un paso de teoría a práctica no siempre fácil, e imposible sin el apoyo de mis compañeras de laboratorio. Nueve años plagados de alegrías y de momentos difíciles. Nueve años, que espero que sean seguidos por muchos más.

Al finalizar un trabajo tan lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable acordarse de las personas que me han facilitado el camino hasta llegar a un feliz término de la misma, por ello es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para agradecer a todas ellas cuanto han hecho por mí para que esta tesis viera la luz.

En especial a la Dra. Marisa Maestro, directora de esta tesis, por hacer honor a su apellido e impulsar el desarrollo de mi formación profesional, por su tiempo compartido y por apoyarme tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por guiarme en mi carrera de investigación, por su disponibilidad y paciencia. Nunca olvidare donde empezó todo, mis primeros pasos con la bata blanca.

Al Profesor Eduardo Díaz Rubio, director de esta investigación, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, por la orientación, el seguimiento y la supervisión de la misma, pero sobre todo por su apoyo y confianza en mi trabajo.

A mis compañeras desde el minuto uno, mi codirectora, la Dra. Marta Vidaurreta y a la Dra. Sara Rafael, por hacer la palabra equipo digna de todo su significado, por hacer del apoyo mutuo una forma de trabajo. Junto a vosotras he aprendido que la amistad en el trabajo y la profesionalidad pueden ir unidas. Junto a vosotras hice mi primera PCR y desde entonces no he parado.

A mis compañeras, Virginia de la Orden y Beatriz Mediero que completaron este fantástico equipo aportando además su colaboración en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Javier Cerdán por su importante aporte a este trabajo, sin el cual no podría haberse llevado a cabo, por su colaboración y disposición para ayudarme siempre que lo he necesitado.

A la Dra. Cristina Fernández por su participación activa en el desarrollo de esta tesis, por su paciencia y disponibilidad para recibirme así como su valiosa ayuda en la comprensión de las técnicas estadísticas.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su apoyo incondicional a través del tiempo. Por haberme apoyado en la difícil decisión de continuar mis estudios fuera de nuestra ciudad.

A mi hermana Nerea por estar conmigo siempre que la necesito, apoyarme y ser una parte fundamental en mi vida.

A Guadalupe, José Luis y David, por hacerme sentir parte de vuestra familia y por vuestra disposición a echarme una mano en lo que haga falta.

A Diego, por apoyarme siempre, por creer en mí de forma incondicional, por compartir los buenos y malos momentos y por ser mi apoyo emocional. Por formar una gran familia junto a mí y a Álvaro.

Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis así como a los profesores que marcaron cada etapa de mi formación universitaria y profesional.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN | III |
| SUMMARY | XI |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. EPIDEMIOLOGÍA | 3 |
| 2. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA | 10 |
| 2.1. Morfología e histología de colon y recto. | 10 |
| 2.2. Morfología e histología de pólipos en colon y recto. | 16 |
| 2.3. Morfología e histología de carcinomas en colon y recto. | 24 |
| 3. FACTORES DE RIESGO | 28 |
| 3.1. Dieta. | 29 |
| 3.2. Micronutrientes. | 33 |
| 3.3. Estilo de vida. | 35 |
| 3.4. Fármacos. | 37 |
| 3.5. Edad. | 39 |
| 3.6. Enfermedad intestinal inflamatoria. | 40 |
| 4. ETIOPATOGENIA | 42 |
| 4.1. Clasificación de los tumores colorrectales. | 42 |
| 4.2. Síndromes hereditarios que predisponen al CCR. | 44 |
| 4.3. Síndromes raros asociados al CCR. | 50 |
| 5. FACTORES PRONÓSTICO | 53 |
| 5.1. Estadío tumoral. | 55 |
| 5.2. Tipo histológico. | 62 |
| 5.3. Grado de diferenciación celular. | 63 |

| | |
|---|-----|
| 5.4. Factores séricos. | 64 |
| 5.5. Factores moleculares. | 65 |
| 6. SECUENCIA ADENOMA CARCINOMA | 69 |
| 7. BASES GENÉTICAS DE LA CARCINOGENESIS COLORRECTAL | 71 |
| 7.1. Vías de desarrollo del carcinoma colorrectal. | 71 |
| 7.2. Patrones de alteración génica. | 75 |
| 7.3. Genes implicados en la carcinogénesis. | 79 |
| 7.4. Ciclo celular. | 84 |
| 8. GEN <i>BRAF</i> | 88 |
| 8.1. Descripción del gen <i>BRAF</i> . | 88 |
| 8.2. Alteraciones en el gen <i>BRAF</i> . | 89 |
| 9. GEN <i>P16</i> | 93 |
| 9.1. Descripción del gen <i>P16</i> . | 93 |
| 9.2. Alteraciones en el gen <i>P16</i> . | 95 |
| 10. VARIABLE MET2 | 96 |
| OBJETIVOS | 99 |
| HIPÓTESIS | 103 |
| PACIENTES Y MÉTODO | 107 |
| 1. PACIENTES | 107 |
| 1.1. Periodo de estudio. | 107 |
| 1.2. Población de estudio. | 107 |
| 2. MÉTODO | 109 |
| 2.1. Metodología clínica. | 109 |
| 2.2. Metodología analítica. | 110 |

| | |
|--|-----|
| 2.3. Metodología estadística. | 121 |
| RESULTADOS | 127 |
| 1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN | 127 |
| 2. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN <i>BRAF</i> Y LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN <i>P16</i> | 130 |
| 2.1. Estudio de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> . | 130 |
| 2.2. Estudio del estado de metilación del promotor del gen <i>P16</i> . | 130 |
| 3. ANÁLISIS DE LA VARIABLE MET2 | 131 |
| 3.1. Descripción de la población en la que se ha evaluado MET2. | 131 |
| 3.2. Estudio de la variable MET2. | 134 |
| 4. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN <i>BRAF</i> , DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN <i>P16</i> Y DE LA VARIABLE MET2 CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS | 135 |
| 4.1. Estudio de la relación de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> con los factores pronóstico clásicos. | 135 |
| 4.2. Estudio de la relación del estado de metilación del promotor del gen <i>P16</i> con los factores pronóstico clásicos. | 138 |
| 4.3. Estudio de la relación de la variable MET2 con los factores pronóstico clásicos. | 142 |
| 5. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES GENÉTICAS | 145 |
| 5.1. Estudio de la relación entre la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> y la metilación del promotor de <i>P16</i> . | 145 |
| 5.2. Estudio de la relación entre la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> y la variable MET2. | 147 |
| 5.3. Estudio de la relación entre la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> y la MSI. | 148 |

| | |
|--|-----|
| 5.4. Estudio de la relación entre la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> y la metilación del promotor del gen <i>hMLH1</i> . | 149 |
| 5.5. Estudio de la relación entre la metilación del promotor del gen <i>P16</i> y la metilación del promotor del gen <i>hMLH1</i> . | 150 |
| 5.6. Estudio de la relación entre la metilación del promotor del gen <i>P16</i> y la MSI. | 151 |
| 5.7. Estudio de la relación entre la variable MET2 y la MSI. | 152 |
| 6. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL | 153 |
| 6.1. Estudio de la supervivencia global. | 153 |
| 6.2. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con cáncer colorrectal en relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos. | 154 |
| 6.3. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con cáncer colorrectal en relación con las alteraciones genéticas estudiadas. | 158 |
| 6.4. Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y las variables genéticas. | 162 |
| 6.5. Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas. | 177 |
| 6.6. Análisis multivariable de la supervivencia global. | 181 |
| 7. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD | 183 |
| 7.1. Estudio de la supervivencia libre de enfermedad. | 183 |

| | |
|--|-----|
| 7.2. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recaer en los pacientes con cáncer colorrectal en relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos. | 184 |
| 7.3. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recaer de los pacientes con cáncer colorrectal en relación con las alteraciones genéticas estudiadas. | 186 |
| 7.4. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico y las variables genéticas. | 190 |
| 7.5. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre las variables genéticas. | 202 |
| 7.6. Análisis multivariable de la supervivencia libre de enfermedad. | 207 |
| DISCUSIÓN | 211 |
| CONCLUSIONES | 239 |
| BIBLIOGRAFÍA | 243 |
| ABREVIATURAS | 285 |
| ANEXO | 291 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1: Importancia relativa de las principales causas de muerte y de las diferencias hombre-mujer.

3

Figura 2: Incidencia y mortalidad estandarizadas por edad de los cánceres más frecuentes. Datos de hombres y mujeres en la población mundial.

5

Figura 3: Mortalidad por cáncer en mujeres en España. Globocan 2008, IARC.

8

Figura 4: Mortalidad por cáncer en hombres en España. Globocan 2008, IARC.

8

Figura 5: Histología del intestino grueso.

11

Figura 6: Esquema de la mucosa del colon.

13

Figura 7: Secuencia adenoma-carcinoma.

69

Figura 8: Alteraciones genéticas en la evolución desde el adenoma hacia el carcinoma.

72

Figura 9: Esquema del ciclo celular y sus diferentes fases.

85

Figura 10: Esquema de la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK.

88

Figura 11: Estructura del locus *CDKN2A*.

94

Figura 12: Esquema de la actividad de *P16*.

94

Figura 13: Esquema de la metodología FRET.

112

Figura 14: Esquema de la región amplificada y de la localización de los cebadores y de las sondas en el gen *BRAF*.

113

Figura 15: Análisis de *melting* para la determinación de la mutación V600E.

115

| | |
|---|-----|
| Figura 16: Secuencia del tratamiento con bisulfito. | 116 |
| Figura 17: Esquema de la qMSP. | 117 |
| Figura 18: Esquema del funcionamiento de las sondas tipo Taqman. | 118 |
| Figura 19: Distribución de tumores colorrectales según la localización. | 127 |
| Figura 20: Distribución de tumores colorrectales según el tipo histológico. | 128 |
| Figura 21: Distribución de tumores colorrectales según el estadio. | 128 |
| Figura 22: Distribución de tumores colorrectales según el grado de diferenciación. | 129 |
| Figura 23: Distribución de tumores colorrectales según la localización en la población de pacientes analizados para la variable MET2. | 132 |
| Figura 24: Distribución de tumores colorrectales según el tipo histológico en la población de pacientes analizados para la variable MET2. | 132 |
| Figura 25: Distribución de tumores colorrectales según el estadio en la población de pacientes analizados para la variable MET2. | 133 |
| Figura 26: Distribución de tumores colorrectales según el grado de diferenciación en la población de pacientes analizados para la variable MET2. | 134 |
| Figura 27: Distribución del porcentaje de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> según la localización de los tumores colorrectales. | 136 |
| Figura 28: Distribución del porcentaje de la metilación del gen <i>P16</i> según la edad de los pacientes con CCR. | 139 |
| Figura 29: Distribución del porcentaje de la metilación del gen <i>P16</i> según la localización de los tumores colorrectales. | 140 |

| | |
|--|-----|
| Figura 30: Distribución del porcentaje de la metilación del gen <i>P16</i> según el grado de diferenciación de los tumores colorrectales. | 141 |
| Figura 31: Distribución del porcentaje de la metilación MET2 según la edad de los pacientes con CCR. | 142 |
| Figura 32: Distribución del porcentaje de la metilación MET2 según la localización de los tumores colorrectales. | 143 |
| Figura 33: Distribución del porcentaje de la metilación MET2 según el grado de diferenciación de los tumores colorrectales. | 144 |
| Figura 34: Distribución de la mutación del gen <i>BRAF</i> en los pacientes con CCR según la metilación del promotor de <i>P16</i> . | 147 |
| Figura 35: Distribución de la metilación MET2 en los pacientes con CCR según la mutación del gen <i>BRAF</i> . | 148 |
| Figura 36: Distribución de la mutación del gen <i>BRAF</i> en los pacientes con CCR según la inestabilidad de microsatélites. | 149 |
| Figura 37: Distribución de la mutación del gen <i>BRAF</i> en los pacientes con CCR según la metilación del promotor de <i>hMLH1</i> . | 150 |
| Figura 38: Distribución de la metilación del promotor de <i>P16</i> en los pacientes con CCR según la inestabilidad de microsatélites. | 152 |
| Figura 39: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal. | 154 |
| Figura 40: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según el estadio de Dukes. | 155 |
| Figura 41: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según la edad. | 156 |

| | |
|---|-----|
| Figura 42: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según el tipo histológico. | 157 |
| Figura 43: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según el grado de diferenciación tumoral. | 157 |
| Figura 44: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de la mutación V600E. | 159 |
| Figura 45: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de metilación del promotor de <i>P16</i> . | 160 |
| Figura 46: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de metilación MET2. | 162 |
| Figura 47: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> en tumores colorrectales en estadio D. | 164 |
| Figura 48: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> en tumores colorrectales con localización distal. | 165 |
| Figura 49: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de metilación del promotor del gen <i>P16</i> en varones con CCR. | 168 |
| Figura 50: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de metilación del promotor del gen <i>P16</i> en tumores colorrectales de grado II. | 170 |
| Figura 51: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de metilación MET2 en varones con CCR. | 173 |
| Figura 52: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de metilación MET2 en tumores colorrectales de localización distal. | 174 |
| Figura 53: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR. | 184 |

| | |
|--|-----|
| Figura 54: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según el estadio de Dukes. | 185 |
| Figura 55: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de la mutación V600E en el gen <i>BRAF</i> . | 187 |
| Figura 56: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de la metilación del promotor del gen <i>P16</i> . | 188 |
| Figura 57: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de la metilación MET2. | 190 |
| Figura 58: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación del promotor de <i>P16</i> en los tumores colorrectales con grado III de diferenciación. | 196 |
| Figura 59: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación MET2 en los pacientes con CCR con 71 años o más. | 199 |
| Figura 60: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación MET2 en tumores colorrectales con localización proximal. | 200 |
| Figura 61: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación del promotor del gen <i>P16</i> en tumores colorrectales con metilación en el promotor del gen <i>hMLH1</i> . | 205 |
| Figura 62: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación MET2 en tumores colorrectales con la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> . | 207 |

ÍNDICE DE TABLAS

Página

| | |
|---|----|
| Tabla I: Incidencia y mortalidad del cáncer y del CCR en diferentes regiones. Tasas anuales ajustadas por edad a la población mundial por 100.000 habitantes. Globocan 2008. | 4 |
| Tabla II: Clasificación de Crawford de los pólipos epiteliales colónicos. | 17 |
| Tabla III: Principales factores que condicionan el potencial maligno de un pólipo adenomatoso. | 21 |
| Tabla IV: Clasificación de los carcinomas de colon y recto según la OMS. | 25 |
| Tabla V: Factores de riesgo asociados a CCR. | 29 |
| Tabla VI: Principales síndromes genéticos asociados al CCR. | 43 |
| Tabla VII: Riesgo de CCR relacionado con los diversos síndromes genéticos asociados al CCR. | 44 |
| Tabla VIII: Factores pronóstico definidos por la AJCC. | 54 |
| Tabla IX: Clasificación del estadio modificada. | 56 |
| Tabla X: Estadios definidos en la 7ª edición del manual de estadificación del cáncer de la AJCC. | 57 |
| Tabla XI: Categorías de clasificación de la nomenclatura TNM. | 58 |
| Tabla XII: Clasificación TNM 1997, 4ª edición, y su equivalencia con la clasificación de Dukes. | 59 |
| Tabla XIII: Relación entre el estadio TNM y la supervivencia en CCR. | 60 |
| Tabla XIV: Principales genes implicados en la carcinogénesis colorrectal. | 80 |

| | |
|--|-----|
| Tabla XV: Secuencias de los cebadores y de las sondas utilizados en la determinación de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> . | 114 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabla XVI: Secuencias de cebadores y sondas usadas en la determinación de la metilación <i>P16</i> . | 120 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabla XVII: Prevalencia de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> en relación con las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos en la serie de pacientes con CCR. | 137 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabla XVIII: Prevalencia de la metilación del promotor de <i>P16</i> en relación con las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos en la serie de pacientes con CCR. | 141 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabla XIX: Prevalencia de la metilación MET2 en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos en la serie de pacientes con CCR y MSI. | 145 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabla XX: Prevalencia de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> en relación con la metilación del promotor de <i>P16</i> . Serie de pacientes con CCR. | 146 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabla XXI: Prevalencia de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> en relación con la metilación MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI. | 147 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabla XXII: Prevalencia de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> en relación con la inestabilidad de microsatélites. Serie de pacientes con CCR. | 148 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabla XXIII: Prevalencia de la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> en relación con la metilación del promotor de <i>hMLH1</i> . Serie de pacientes con CCR y MSI. | 149 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabla XXIV: Prevalencia de la metilación del promotor de <i>P16</i> en relación con la metilación del promotor de <i>hMLH1</i> . Serie de pacientes con CCR y MSI. | 151 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabla XXV: Prevalencia de la metilación del promotor de <i>P16</i> en relación con la inestabilidad de microsatélites. Serie de pacientes con CCR. | 151 |
| Tabla XXVI: Prevalencia de MSI en relación con MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI. | 152 |
| Tabla XXVII: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con las variables clínico-patológicas en la serie de pacientes con CCR. | 158 |
| Tabla XXVIII: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con la mutación V600E. Serie de pacientes con CCR. | 159 |
| Tabla XXIX: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con la metilación de <i>P16</i> . Serie de pacientes con CCR. | 161 |
| Tabla XXX: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con la metilación MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI. | 162 |
| Tabla XXXI: Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio de la mutación del gen <i>BRAF</i> en la serie de pacientes con CCR. | 166 |
| Tabla XXXII: Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y la metilación del promotor del gen <i>P16</i> en la serie de pacientes con CCR. | 171 |
| Tabla XXXIII: Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y la metilación del promotor de MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI. | 176 |
| Tabla XXXIV: Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas y la mutación V600E del gen <i>BRAF</i> . Serie de pacientes con CCR. | 178 |

Tabla XXXV: Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas y la metilación del promotor del gen *P16*. Serie de pacientes con CCR. 180

Tabla XXXVI: Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas y la metilación MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI. 181

Tabla XXXVII: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con las variables clínico-patológicas en los pacientes con CCR con cirugía curativa. 186

Tabla XXXVIII: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con la mutación V600E del gen *BRAF*. Serie de pacientes con CCR. 187

Tabla XXXIX: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con la metilación del promotor del gen *P16*. Serie de pacientes con CCR. 189

Tabla XL: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con la variable genética MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI. 189

Tabla XLI.: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico clásicos y la mutación V600E del gen *BRAF*. Serie de pacientes con CCR. 193

Tabla XLII.: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico clásicos y la metilación del promotor de *P16*. Serie de pacientes con CCR. 197

Tabla XLIII.: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico clásicos y la metilación MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI. 201

Tabla XLIV: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre la MSI, la metilación de *hMLH1* y la metilación de *P16* y la mutación V600E del gen *BRAF*. Serie de pacientes con CCR. 203

Tabla XLV: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre la MSI y la metilación de *hMLH1* y la metilación de *P16*. Serie de pacientes con CCR 205

Tabla XLVI: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre la mutación V600E del gen *BRAF* y MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI. 206

RESUMEN

“EFECTO DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* Y DE LAS ALTERACIONES EPIGENÉTICAS DE LOS GENES *P16* Y *HMLH1* EN EL CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO. VALOR PRONÓSTICO.”

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte asociada a cáncer en ambos sexos. La tumorigénesis colorrectal se produce como consecuencia de la acumulación de diferentes mutaciones genéticas. Las mutaciones asociadas al CCR se agrupan en tres vías independientes con diferente efecto en el pronóstico: vía de inestabilidad cromosómica caracterizada por ganancias o pérdidas de cromosomas completos o de gran parte de estos, vía de inestabilidad de microsatélites (MSI) causada por alteraciones en los sistemas de reparación del ADN y vía de la metilación caracterizada por una metilación errónea en las islas CpG en las regiones promotoras de diversos genes.

El gen *BRAF* es un protooncogén que activa la vía de transducción de señales RAS/RAF/MER/ERK. y aparece mutado en el 5% de los CCR. La mutación V600E es la alteración más frecuente y produce una activación constitutiva del gen. Esta mutación se relaciona con la vía de la MSI y con la vía de la metilación.

P16 es un gen supresor de tumores que detiene el ciclo celular en la fase G₁. La hipermetilación de su promotor provoca el silenciamiento transcripcional lo que conlleva a la progresión continua del ciclo celular. Este tipo de alteración se ha descrito en el 40% de los CCR, parte de los cuales se desarrollan por la vía de la metilación.

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de la mutación V600E del gen *BRAF* y de la metilación del promotor del gen *P16* y estudiar su relación con otras alteraciones genéticas analizadas previamente, MSI y metilación en el promotor del gen *hMLH1*, y con los factores pronóstico clásicos en el CCR y analizar su efecto en el pronóstico.

Pacientes y métodos

Se reclutaron 326 pacientes intervenidos en el Hospital Clínico San Carlos por CCR esporádico. Durante la cirugía se tomó una muestra tumoral de cada paciente para realizar las determinaciones genéticas. cuantitativa específica de metilación. Se analizó la mutación V600E del gen *BRAF* mediante PCR a tiempo real y análisis de curvas de desnaturalización. La metilación del promotor del gen *P16* fue determinada mediante PCR

Se creó una nueva variable denominada MET2 que se generó con la metilación simultánea de los genes *P16* y *HMLH1*. Esta variable se estudió en 51 pacientes, correspondientes a los tumores con MSI.

Resultados

La frecuencia de la mutación V600E fue del 4,3%, y se asoció con la localización proximal en colon. La mutación del gen *BRAF* también se asoció con las variables genéticas analizadas, siendo significativamente más frecuente en los tumores MSI de alto grado (MSI-H) y en los que presentaban metilación en *P16*, en *hMLH1* y

metilación MET2. En la localización distal, la mutación V600E es un factor de peor pronóstico en la supervivencia global (SG).

La frecuencia de la metilación del promotor del gen *P16* fue del 24,8% y se asoció con la localización proximal en colon y con los tumores pobremente diferenciados. *P16* metilado fue más frecuente en los tumores que presentaban MSI-H, MSI de bajo grado (MSI-L) y metilación de *hMLH1*. En los hombres, la metilación de *P16* tuvo un efecto negativo en la SG, y en los tumores moderadamente diferenciados la metilación de *P16* mostró tendencia de peor pronóstico en la SG. Sin embargo, en el análisis multivariable de *P16*, la ausencia de metilación mostró una reducción del riesgo del 12,0% en la SG. En relación a la supervivencia libre de enfermedad (SLE), los tumores menos diferenciados presentaron mejor pronóstico en presencia de metilación de *P16*.

La metilación MET2 se detectó en el 33,3% de los tumores MSI. Esta variable se asoció con la localización proximal en colon y con tumores pobremente diferenciados. En la localización distal del colon, la metilación MET2 tuvo un efecto negativo en la SG. El análisis de la SLE mostró que los tumores con metilación MET2 presentaban menor riesgo de recaer. En la localización proximal del colon también se observó este efecto protector. Además, la mutación del gen *BRAF* presentó un efecto reductor en el riesgo de recaer en el grupo de tumores con metilación MET2. La variable MET2 tiene un efecto protector independiente en la SLE, ya que no recaeró ningún paciente.

Conclusiones

1. La frecuencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en nuestra cohorte de pacientes con CCR esporádico es de 4%. Esta alteración es más frecuente en tumores localizados en colon proximal.
2. La mutación en el gen *BRAF* es más frecuente en los tumores que presentan MSI-H, metilación en *P16*, metilación en *hMLH1* y metilación MET2.
3. La frecuencia de la metilación de *P16* en esta cohorte de pacientes con CCR esporádico es de 24,2%. La metilación aparece más frecuentemente en tumores localizados en colon proximal y en los tumores menos diferenciados.
4. La metilación de *P16* es significativamente más frecuente en los tumores que presentaban MSI-H y MSI-L.
5. La frecuencia de la metilación MET2 en nuestra cohorte de pacientes con CCR esporádico es de 33,3%. Esta metilación es más frecuente en los tumores de localización proximal y en los tumores menos diferenciados.
6. La mutación V600E es un factor de peor pronóstico en la SG de los pacientes con tumores de localización distal.
7. La presencia de la metilación de *P16* supone un incremento del riesgo de fallecer en los pacientes con tumores moderadamente diferenciados.
8. La metilación MET2 es un factor de peor pronóstico en la SG de los pacientes con tumores de localización distal.

9. En los tumores de colon proximal, la variable MET2 se comporta como factor pronostico independiente en la SG.
10. La metilación de *P16* es un factor de mejor pronóstico en la SLE de los pacientes con tumores menos diferenciados.
11. Los tumores con metilación MET2 presentan una reducción en el riesgo de recaer.
12. La presencia de la metilación MET2 presenta un efecto reductor en el riesgo de recaer en el grupo de tumores con localización proximal.
13. La mutación V600E presenta un efecto reductor en el riesgo de recaer en el grupo de tumores con metilación MET2.
14. La variable MET2 tiene un efecto protector fuerte independiente en la SLE.

Palabras clave

Cáncer colorrectal, *BRAF*, metilación, *hMLH1*, *P16*, CIMP, pronóstico.

SUMMARY

“EFFECT OF *BRAF* GENE V600E MUTATION AND EPIGENETIC ALTERATIONS OF *P16* AND *HMLH1* GENES IN SPORADIC COLORECTAL CANCER. PROGNOSIS VALUE.”

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer mortality in both sexes. Colorectal tumorigenesis occurs as a result of the accumulation of different genetic mutations. CRC associated mutations are clustered in three separate pathways with different effect on prognosis: the chromosomal instability pathway characterized by losing or gaining whole chromosomes or large parts of chromosomes, the microsatellite instability pathway (MSI) caused by defects in DNA mismatch repair system and the methylation pathway characterized by an erroneous methylation in CpG islands in the promoter regions of various genes.

BRAF gene is a protooncogene which activates the RAS/RAF/MER/ERK signal transduction pathway. This gene appears mutated in 5% of CRCs. The V600E mutation is the most frequent alteration in CRC and causes constitutive activation of the gene. This mutation is associated with MSI pathway and methylation pathway.

P16 is a tumor suppressor gene that arrests cell cycle in G1 phase. *P16* promoter hypermethylation causes transcriptional silencing causing continuous progression of cell cycle. This alteration has been described in 40% of CRC, some of which are developed by methylation pathway.

The aim of this study was to determine the frequency of BRAF gene V600E mutation and promoter methylation of p16 gene and to study its relationship with to other genetic alterations previously analyzed, MSI and methylation in hMLH1 gene promoter, and with classical prognosis factors in CRC and to analyze its effect on prognosis.

Patients and methods

A total of 326 patients who underwent a surgical resection for sporadic CRC at the Hospital Clínico San Carlos were enrolled. A tumor sample was collected during patient surgery for genetic determinations. We analyzed the *BRAF* gene V600E mutation using real time PCR and melting curves analysis. Promoter methylation of the *P16* gene was determined by using quantitative methylation specific PCR.

We created a new variable called MET2 that was generated with the simultaneous methylation of *P16* and *hMLH1* genes. This variable was studied in 51 patients, corresponding to tumors with MSI.

Results

V600E mutation frequency was 4.3%, and it was associated with proximal colon location. BRAF mutation was also associated with genetic variables, and was significantly more frequent in high level MSI (MSI-H) tumors and in those with methylation in *P16*, in *hMLH1*, and MET2. At distal location, V600E mutation is a factor of poor prognosis in overall survival (OS).

Frequency of promoter methylation of *P16* gene was 24.8% and was associated with colon proximal and poorly differentiated tumors. *P16* was more frequently methylated in tumors that showed MSI-H, low MSI (MSI-L) and hMLH1 methylation. In men, the methylation of *P16* had a negative effect on OS, and in moderately differentiated tumors, methylation of *P16* showed trend for worse prognosis in OS. However, in multivariable analysis the absence of *P16* methylation showed a 12% risk reduction in OS. Regarding disease-free survival (DFS), poorly differentiated tumors had better prognosis in presence of methylation of *P16*.

MET2 methylation was detected in 33.3% of MSI tumors. This variable was associated with proximal colon and less differentiated tumors. In the distal colon, methylation MET2 had a negative effect on OS. DFS analysis showed that tumors with MET2 methylation presented lower recurrence risk. In proximal colon location this protective effect was also observed. Furthermore, mutation of *BRAF* gene had an effect in reducing the risk of recurrence in the group of tumors with methylation MET2. MET2 variable has a strong protective independent effect on DFS since no patients had no recurrence.

Conclusions

1. Frequency of *BRAF* gene V600E mutation in our cohort of patients with sporadic CRC is 4%. This alteration is more common in tumors located in proximal colon.
2. Mutation of *BRAF* gene is more frequent in tumors with MSI-H, *P16* methylation, *hMLH1* methylation and MET2 methylation.

3. Frequency of *P16* methylation in our cohort is 24.2%. Methylation occurs more frequently in tumors located in proximal colon and poorly differentiated tumors.
4. Methylation of *P16* is significantly more frequent in tumors that showed MSI-H and MSI-L.
5. Frequency of MET2 methylation in our cohort of patients with sporadic CRC is 33.3%. This methylation is more common in tumors located in proximal colon and poorly differentiated tumors.
6. V600E mutation is a poor prognostic predictor in OS in patients with tumors at distal location.
7. Methylation of *P16* confers an increased risk of death in patients with moderately differentiated tumors.
8. MET2 methylation is a factor of poor prognosis for OS in patients with tumors located distally.
9. In proximal colon tumors, MET2 variable behaves like an independent prognostic factor in OS.
10. Methylation of *P16* is a predictor of good prognosis in DFS in patients with less differentiated tumors.
11. Tumors with MET2 methylation show a reduction in the risk of recurrence.
12. Presence of MET2 methylation has an effect in reducing the risk of recurrence in tumors with proximal location.

13. V600E mutation has an effect in reducing the risk of recurrence in the group of tumors with MET2 methylation.
14. MET2 variable has a strong independent protective effect in DFS.

Key words

Colorectal cancer, *BRAF*, methylation, *hMLH1*, *P16*, CIMP, prognosis.

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA

Los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la distribución de muertes en el mundo sitúan al cáncer en segundo lugar, por detrás de las enfermedades cardiovasculares en los países desarrollados, y en tercer lugar en los países en vías de desarrollo, por detrás de las enfermedades cardiovasculares y de las enfermedades infecciosas y parasitarias.¹ En el año 2004 se estima que hubo 58,8 millones de muertes en el mundo, 27,7 mujeres y 31,1 hombres (Figura 1).

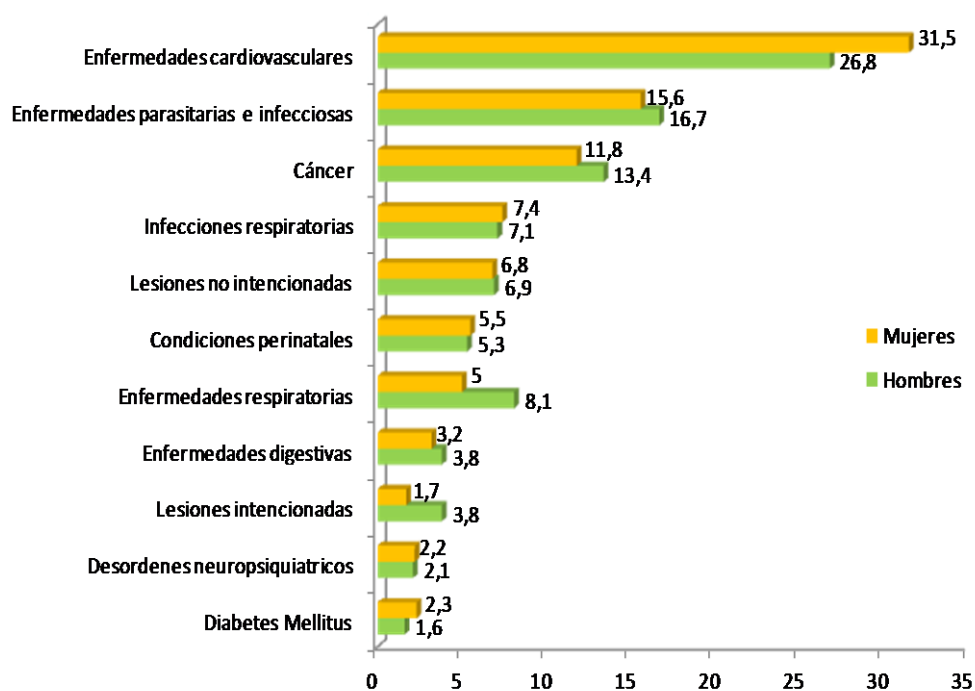


Figura 1: Importancia relativa de las principales causas de muerte y de las diferencias hombre-mujer.¹

Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en el Mundo (IARC), de la OMS, en el año 2008 hubo 12,7 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo (6.639.430 en hombres y 6.038.545 en mujeres) y 7,6 millones de muertes por cáncer (4.225.662 en hombres y 3.345.834 en mujeres).² Las neoplasias con mayor

incidencia en el mundo son: pulmón (1,6 millones de casos en el año 2008), colorrectal (CCR) (1,23 millones) y estómago (989.598 casos). Debido a su mal pronóstico, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer (1,37 millones) seguido por el cáncer de estómago (738.069 muertes) y por el cáncer hígado (695.843).²

Existen grandes diferencias según el desarrollo de los países en cuanto a la incidencia y mortalidad causada por neoplasias (Tabla I). La incidencia del CCR también muestra una amplia variación geográfica, los datos de la OMS-IARC revelan tasas muy altas en países muy desarrollados; Nueva Zelanda, Australia, América del norte, Europa y Japón y tasas muy bajas en países en vías de desarrollo de Asia y África.^{3,4}

Tabla I: Incidencia y mortalidad del cáncer y del CCR en diferentes regiones. Tasas anuales ajustadas por edad a la población mundial por 100.000 habitantes. Globocan 2008.²

| Población | Incidencia del cáncer | Mortalidad por cáncer | Incidencia CCR | Mortalidad por CCR |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| África | 111 | 86,6 | 5,9 | 4,7 |
| América del Norte | 299,9 | 105,1 | 30,1 | 9,1 |
| América del Sur | 171,9 | 100,3 | 12,6 | 7,1 |
| Asia | 153,6 | 102,6 | 12,9 | 6,7 |
| Europa | 247,6 | 118,1 | 29,5 | 13,3 |
| Oceanía | 290,6 | 106,5 | 35,5 | 12,4 |
| Regiones más desarrolladas | 256,2 | 111,6 | 30,1 | 12 |
| Regiones menos desarrolladas | 147,8 | 101,3 | 10,7 | 6,1 |
| Global | 181,8 | 106,2 | 17,3 | 8,2 |
| España | 241,4 | 109,5 | 30,4 | 13,3 |

Existen diferencias en la incidencia y mortalidad por cáncer según el género (Figura 2). En los hombres el cáncer con mayor incidencia es el de pulmón, seguido por el de próstata, colorrectal y estómago. Estas neoplasias causan las principales muertes por cáncer en varones. En mujeres el cáncer de mayor incidencia es el de mama, seguido por el cáncer de útero, colorrectal y pulmón. El cáncer de mama también es el que mayor número de muertes causa en mujeres, seguido por el de pulmón, útero y colorrectal.^{2,5}

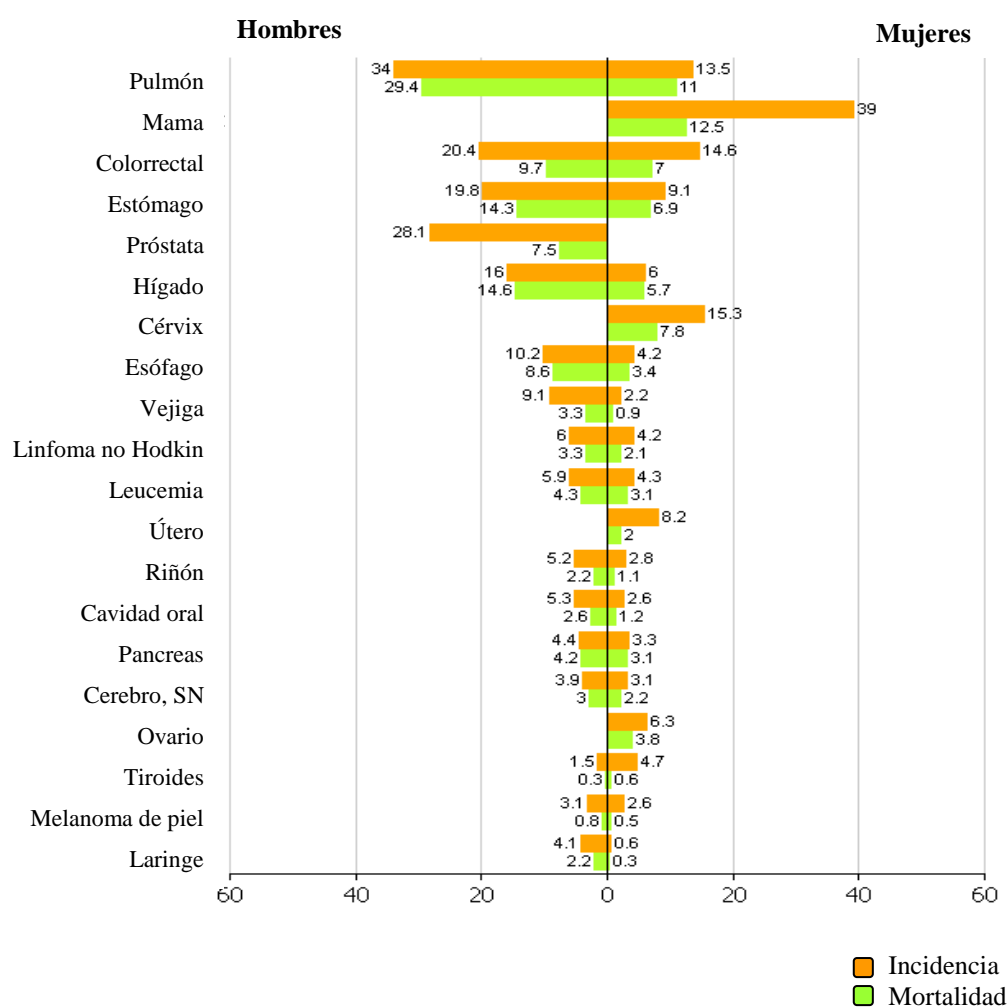


Figura 2: Incidencia y mortalidad estandarizadas por edad de los cánceres más frecuentes. Datos de hombres y mujeres en la población mundial.²

En el CCR la incidencia ajustada por edad y raza es mayor en hombres que en mujeres, tanto en colon proximal como distal. La incidencia de cáncer de colon y recto en hombres es un 20% y un 50%, respectivamente, mayor que en mujeres pero la tasa de mortalidad por CCR es similar en ambos, siendo el ratio hombre: mujer de 1.05:1.00.^{4,6}

En Europa, en el año 2008 hubo 3.223.840 casos de cáncer (1.721.797 hombres y 1.502.043 mujeres) y 1.721.828 muertes por cáncer (962.113 hombres y 759.715 mujeres)².

La mortalidad e incidencia en España son menores que las de los países del norte de Europa, con unas tasas por debajo de las tasas promedio de Europa, pero con una tendencia temporal de incremento⁷ (Tabla I). En hombres, España presenta unas tasas ajustadas superiores a las del promedio de la Unión Europea, ocupando el quinto lugar. Sin embargo, la incidencia y mortalidad por cáncer de las mujeres españolas son de las más bajas de Europa.⁸

En España el cáncer es la segunda causa de muerte seguido de las enfermedades cardiovasculares. En el año 2008 se diagnostican en España 196.902 casos nuevos de cáncer, de los que 28.551 corresponden a carcinomas colorrectales, que es el tumor más frecuente de todos en términos absolutos. Se estima que en el año 2020 los casos de CCR sean unos 35.196.²

Según los últimos datos publicados en el Instituto Nacional de Estadística (INE), en España, los tumores fueron los responsables del 26,9% del total de fallecimientos en el año 2008, se produjeron 103.999 defunciones por esta causa, lo que supuso un aumento del 0,6% en comparación con el año 2007.⁹ El CCR fue responsable de 14.303 fallecimientos en el año 2008 y se estima que en el año 2020 haya unas 17.530 muertes por esta causa.²

Durante las últimas décadas la mortalidad por cáncer en España ha mantenido un aumento progresivo. A mediados del siglo XX, se producían aproximadamente 20.000 muertes por cáncer, es decir, el número de muertes se ha multiplicado por cinco, mientras que las tasas brutas casi se han triplicado pasando de 80 por 100.000 habitantes en el año 1951 a 228 por 100.000 habitantes en el año 2008. No obstante, el riesgo de mortalidad por cáncer ha ido disminuyendo desde 1990 hasta 2008.^{10,11}

Respecto a la localización anatómica del cáncer en España en mujeres el cáncer de mama fue el tumor que causó más defunciones en 2008, con 6.051 fallecimientos, 1,1% más que el año 2007, seguido del cáncer de colon con 4.629 defunciones, un 3% más que el año anterior⁹ (Figura 3).

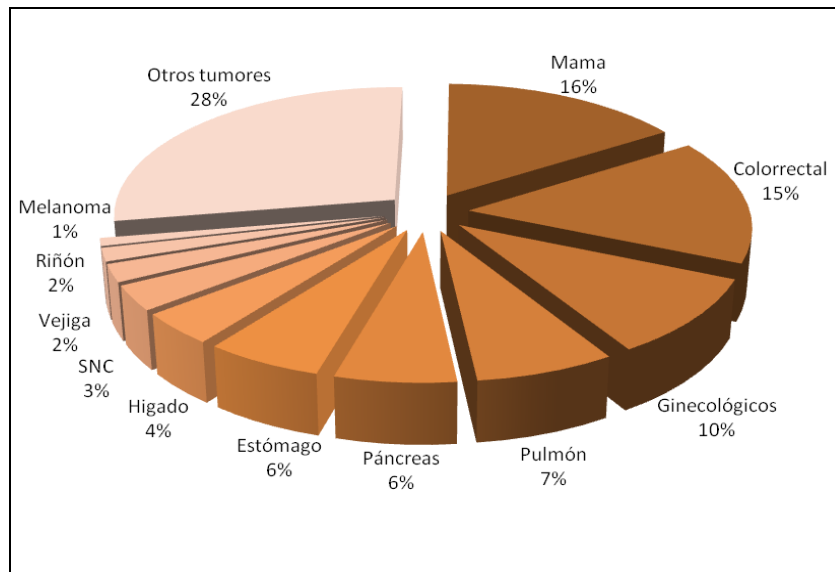


Figura 3: Mortalidad por cáncer en mujeres en España. Globocan 2008, IARC.²

En varones, en España, el cáncer de pulmón fue la neoplasia que provocó más fallecimientos en 2008 con 17.146 defunciones, un 0,2% menos que en 2007. El segundo tipo de cáncer más significativo fue el de colon, con 5.973 fallecidos, y un aumento del 1.0% y el tercero el de próstata, responsable de 5.464 muertes, un 2,1% mayor que el año anterior⁹ (Figura 4).

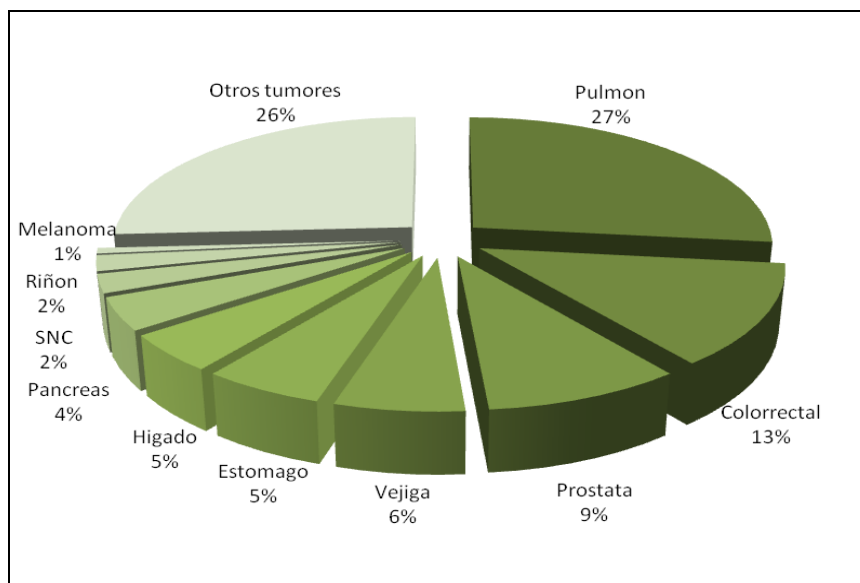


Figura 4: Mortalidad por cáncer en hombres en España. Globocan 2008, IARC.²

Si se establece diferencia entre el cáncer de colon y recto, los datos del INE revelan que en el año 2008 hubo 10.602 defunciones por cáncer de colon (44% en mujeres y 56% en hombres) y 2.514 muertes por cáncer de recto (36% en mujeres y 64% en hombres).⁹

Por todo ello sería de gran interés prevenir este tipo de tumores en estadio precoz, y disminuir su morbilidad. Es necesario un mejor conocimiento del comportamiento biológico de la enfermedad para poder predecir y controlar su evolución.

2. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA

2.1 MORFOLOGÍA E HISTOLOGÍA DE COLON Y RECTO

El intestino embrionario se divide en anterior, medio y posterior, y se desarrolla en la cuarta semana de gestación. El colon proximal se genera a partir del intestino medio embrionario, y esta perfundido por la arteria mesentérica superior. El colon distal y el recto derivan del intestino posterior embrionario y son irrigados por la arteria mesentérica inferior. El canal anal distal tiene origen ectodérmico y recibe sangre desde ramas de la arteria pudenda interna.¹²

El intestino grueso se divide en colon y recto, ambos segmentos tienen secciones intraperitoneales y extraperitoneales. El ciego, el colon transversal y el sigma son las partes intraperitoneales. El colon ascendente, el descendente, los flexos hepático y esplénico y el inicio y final del sigma se localizan en el retroperitoneo. El tercio superior del recto es intraperitoneal.⁶

El colon mide aproximadamente 150 cm, se extiende desde el íleon hasta el recto. La parte más ancha es el ciego, con 7,5-8,5 cm de diámetro, el cual disminuye progresivamente hasta el sigma, donde alcanza la mayor estrechez, de aproximadamente 2,5 cm de diámetro. Las capas de la pared del colon son: mucosa, submucosa, musculatura circular interna, musculatura longitudinal externa y serosa⁶ (Figura 5).

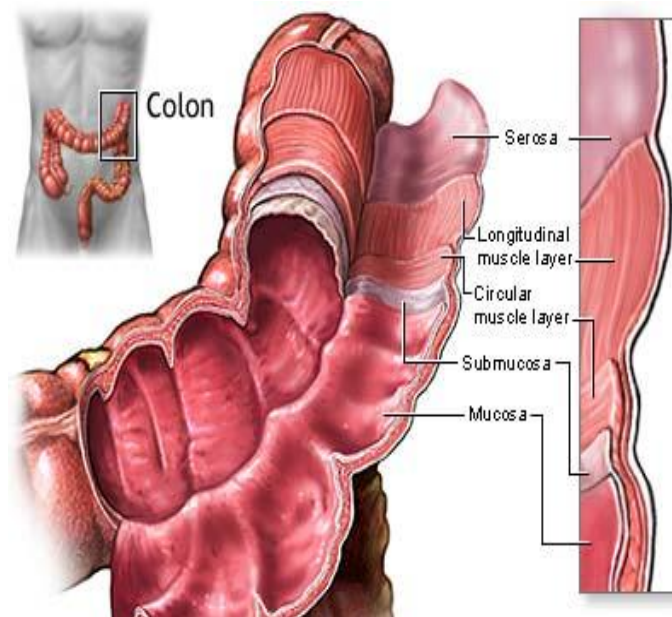


Figura 5: Histología del intestino grueso. Imagen tomada de: www.pennccancer.org

El recto mide unos 12-15 cm y va desde el colon sigmoide hasta el canal anal. La pared del recto se forma por la mucosa, la submucosa y por dos capas musculares completas: interna circular y externa longitudinal.¹³

ESTRUCTURA DE LA PARED COLÓNICA

Mucosa

Es una capa lisa sin pliegues, no presenta vellosidades, está formada por un epitelio cilíndrico simple y por abundantes Criptas de Lieberkuhn, similares a las del intestino delgado pero más largas^{13,14} (Figura 6).

La mucosa se puede dividir en 3 capas:

1. Epitelio: Es la barrera entre el medio externo e interno. Está formada por células

epiteliales cilíndricas que presentan vellosidades cortas e irregulares en su superficie lo que aumenta el área de la célula para facilitar la función de absorción de iones y de líquido, células caliciformes que son glándulas unicelulares que secretan mucina, componente del moco intestinal y células del sistema neuroendocrino difuso que producen hormonas endocrinas y paracrinas.

2. Lámina propia: Es una capa formada por tejido conectivo reticular rico en células, con abundantes glándulas. Su función es la defensa inmunológica y la producción de IgA.
3. *Muscularis mucosae*: Es una delgada capa de fibras musculares que separa la mucosa de la submucosa.

La mucosa del recto es similar a la del colon pero las Criptas de Lieberkuhn son más profundas, menos numerosas y aumenta el número de células caliciformes. Además en su parte interna presenta unos repliegues de mucosa conocidas como válvulas de Houston.

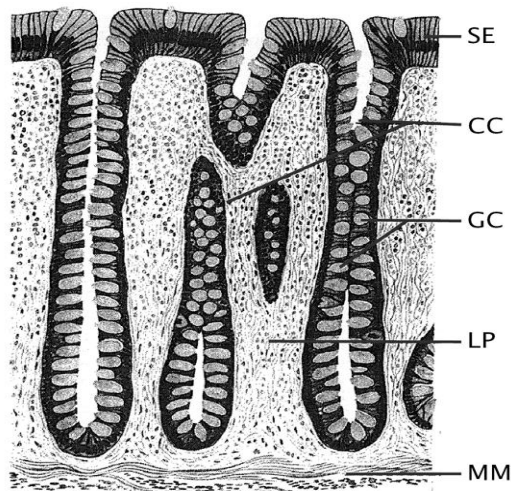


Figura 6: Esquema de la mucosa del colon.¹⁵ SE: epitelio superficial, CC: cripta colónica, GC: células caliciformes, LP: lamina propia, MM: *muscularis mucosae*. Imagen tomada de: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1566.

Submucosa

Es una capa de tejido conectivo laxo con adipocitos y fibroblastos. En ella se encuentran los plexos nerviosos y los plexos vasculares.

Muscular propia

Es la capa formada por dos capas de fibras musculares lisas, la interna y la externa. La capa interna es circular y completa y la externa es longitudinal. En el colon la capa externa no es continua en toda su superficie, sino que forma tres bandas longitudinales planas conocidas como tenias del colon.

En el recto la capa muscular externa no tiene tenias y en la parte final las capas musculares forman un engrosamiento dando lugar al esfínter interno.

Las capas musculares están atravesadas tanto por vasos sanguíneos como linfáticos que se dirigen hacia la serosa. Su función es mezclar y hacer progresar el contenido colónico.

Serosa

La túnica serosa se encuentra revistiendo externamente a aquellos órganos del tubo digestivo intraabdominales, por lo que rodea gran parte del colon a excepción de su segmento distal. Está formada por un tejido conjuntivo denso muy fino, recubierto por una capa de células mesoteliales.

2.1.1 Función colónica

La principal función del colon es la regulación final del agua y del balance electrolítico en el intestino. En él se produce la absorción del agua, sodio y cloruro y se secreta potasio, bicarbonato y mucus. Además es el punto de la digestión de ciertos carbohidratos y proteínas, y favorece la producción bacteriana de vitamina K.¹³

El colon reduce el volumen de las heces mediante la absorción de más del 90% del agua y electrolitos. El sodio y el cloruro se absorben en contra de altos gradientes de concentración, especialmente en el colon distal. El transporte de potasio es principalmente pasivo y el bicarbonato se secreta por intercambio con el cloruro.

La absorción activa de nutrientes es mínima, y se pueden absorber pasivamente ácidos grasos de cadena corta formados a partir de la fermentación bacteriana intraluminal.

Existen un gran número de agentes que pueden estimular la secreción de fluidos y electrolitos al colon, incluidos las bacterias, enterotoxinas, hormonas, neurotransmisores y laxantes. Estos provocan la disminución de la absorción o el aumento de la secreción de agua, sodio y cloruro.

2.1.2 Recambio celular

Las células madre gastrointestinales experimentan múltiples divisiones para dar lugar a todas las células especializadas del tracto gastrointestinal. Las células madre intestinales son células primitivas localizadas en compartimentos especializados formados por células epiteliales y mesenquimales y por sustratos extracelulares.¹⁶

En el epitelio sano del colon hay una renovación casi constante y normal del epitelio superficial a partir de las células madre intestinales. Esta renovación ocurre aproximadamente cada seis días mediante proliferación y diferenciación de las células de la cripta. La proliferación celular se lleva a cabo en la porción inferior de la cripta y se caracteriza porque, tras sufrir mitosis, las células del colon migran hacia la parte superior de la cripta alejándose de las células madre. La diferenciación y la maduración de las células nuevas se llevan a cabo a medida que estas ascienden a lo largo de la

cripta. Las células maduras pierden su capacidad de dividirse de nuevo y finalmente mueren por apoptosis y se secretan a la luz intestinal.¹⁴

Este proceso ordenado se ve alterado progresivamente cuando hay un aumento en la proliferación celular no compensado con fenómenos de apoptosis, de manera que se incrementa el número de células en la superficie de la mucosa, dando lugar a un pólipo o adenoma. El control del ciclo celular es necesario para que esta renovación se produzca correctamente y la mucosa colónica no sufra cambios.

2.2 MORFOLOGÍA E HISTOLOGÍA DE PÓLIPOS EN COLON Y RECTO

Los pólipos son masas de tejido bien definidas que sobresalen desde la pared hacia la luz intestinal. Dependiendo de su naturaleza histológica, los pólipos colorrectales se clasifican en neoplásicos y no neoplásicos.¹⁷

Los pólipos neoplásicos o premalignos se forman como consecuencia de una displasia proliferativa, los pólipos no neoplásicos, sin potencial maligno, se forman como resultado de una maduración o inflamación anormal de la mucosa.¹⁸

La mayoría de los pólipos son asintomáticos, sin embargo, la probabilidad de desarrollar sintomatología aumenta con el tamaño del pólipo.

Pueden ser pediculados si tienen un tallo que une la cabeza del pólipo a la mucosa colorrectal o sésiles si son aplanados y están en contacto directo con la mucosa colorrectal.

Los pólipos colónicos se clasifican según sus características histológicas y los más frecuentes son los adenomas (67%) seguidos de los pólipos hiperplásicos (11%). El resto (22%) está formado por una miscelánea que incluye pólipos inflamatorios, juveniles, mucosos, hamartomatosos y otras lesiones no mucosas.¹⁹ Los pólipos de colon y recto se pueden clasificar en 3 tipos²⁰ (Tabla II).

Tabla II: Clasificación de Crawford de los pólipos epiteliales colónicos.

| |
|--|
| 2.2.1. Pólipos epiteliales no neoplásicos |
| Hiperplásicos |
| Hamartomatosos |
| Inflamatorios |
| Linfoides |
| 2.2.2. Pólipos epiteliales neoplásicos |
| Adenoma Tubular |
| Adenoma Tubulovelloso |
| Adenoma Velloso |
| 2.2.3. Lesiones Mesenquimales |
| Lipoma |
| Leiomioma |
| Angioma |

2.2.1 Pólipos epiteliales no neoplásicos

Pólipos Hiperplásicos

Los pólipos hiperplásicos son pequeños (2-5 mm), únicos o múltiples, asintomáticos y especialmente frecuentes en sigma y recto. La morfología de estos pólipos se caracteriza por el contorno aserrado de las criptas y por tener el mismo color que la mucosa que lo rodea.¹⁸

La teoría patogénica más aceptada es el aumento del recambio epitelial de las bases de las criptas combinado con una menor descamación de las células epiteliales apicales. En los pólipos hiperplásicos no hay hiperplasia de las células epiteliales.²¹

Estos pólipos, particularmente si son grandes y están en colon ascendente, pueden tener un cierto, aunque bajo, potencial de malignización ya que pueden mostrar alteraciones de la expresión de los genes *BCL2*, *BAX* y *P27*, deleciones del cromosoma 1p, sobreexpresión del *P53*, mutaciones de *KRAS* (homólogo del oncogén del virus del sarcoma murino de Kirsten), y pérdida de la heterocigosidad de los genes *APC* (*Adenomatous Poliposis Coli*), *P53* y *P164*.²²

Se ha sugerido que estos pólipos hiperplásicos del colon derecho son más susceptibles de desarrollar carcinomas con inestabilidad de microsatélites (MSI) y una morfología aserrada.²²

Hamartomas

Los pólipos hamartomatosos incorporan tanto componentes epiteliales como estromales. Suelen ser solitarios pero pueden ser múltiples.¹⁸

Este tipo de pólipos suele presentarse en el contexto de uno de los múltiples síndromes de poliposis hamartomatosa: pólipos juveniles colónicos esporádicos o aislados, síndrome de poliposis infantil-juvenil, poliposis juvenil del colon (JPS) y síndrome de Peutz-Jeghers (PJS).²³

Los solitarios aparecen más frecuentemente en colon. Histopatológicamente estos pólipos muestran numerosas criptas tortuosas y dilatadas quísticamente. La lámina propia es edematosa y muestra expansión por un infiltrado linfoide con ocasionales neutrófilos. En los casos con poliposis juvenil el riesgo de transformación maligna puede alcanzar hasta un 60%.²⁴

Inflamatorios

Los pólipos inflamatorios se forman como consecuencia del proceso regenerativo de un foco inflamatorio, por lo que carecen de potencial degenerativo maligno. Estos pólipos pueden, en ocasiones, alcanzar un tamaño notable y se encuentran en diversas enfermedades del colon, como la enfermedad inflamatoria intestinal, la colitis amebiana o la disentería bacilar.²⁵

Los pólipos inflamatorios son proyecciones intraluminales de la mucosa compuestas por una mezcla de componentes epiteliales y estromales no neoplásicos y de

células inflamatorias. Estos incluyen los pseudopólipos asociados o no a colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (CD).²²

Los pseudopólipos inflamatorios son áreas de mucosa con inflamación, regeneración y frecuente ulceración. Se suelen desarrollar como respuesta a enfermedades inflamatorias difusas o localizadas, incluyendo los bordes de úlceras o anastomosis. Hasta el momento no se ha identificado potencial maligno en estos pseudopólipos inflamatorios.²²

Linfoides

Los pólipos linfoides se forman a partir de la expansión de la lámina propia causada por una infiltración linfocítica. Suelen ser pequeños, únicos, sésiles y más frecuentes en el recto.²⁶

Las lesiones rectales suelen ser asintomáticas mientras que los pólipos colónicos producen sangrado y dolor abdominal.²⁴

2.2.2. Pólipos epiteliales neoplásicos

Los pólipos neoplásicos son masas displásicas no malignas, originadas a partir de elementos glandulares, que aparecen como resultado de la proliferación y división celular descontrolada en un área del epitelio glandular del colon.¹³ Se denominan adenomas y se clasifican según su componente vellosa en tubulares, tubulovellosos y vellosos. El componente vellosa supone una proliferación epitelial que da lugar a unas

criptas elongadas semejantes a proyecciones vellosas de la lámina propia rodeadas por epitelio adenomatoso.²⁴

La importancia clínica de los adenomas es su potencial maligno, que hace que puedan convertirse en un carcinoma. Los principales factores de riesgo para la transformación maligna de un adenoma son el tamaño, la histología y la displasia de alto grado (Tabla III).

Tabla III: Principales factores que condicionan el potencial maligno de un pólipo adenomatoso.

| Tamaño | Potencial de Malignidad |
|---------------------------|--------------------------------|
| Menos de 1 cm | 1% |
| Entre 1 y 2 cm | 10% |
| Más de 2 cm | 50% |
| Histología | |
| Tubular | 5% |
| Túbulo-velloso | 20-22% |
| Velloso | 40% |
| Grado de displasia | |
| Mínima | 6% |
| Moderada | 15-18% |
| Severa | 35% |

El 20-40% de la población asintomática mayor de 50 años, presenta adenomas colorrectales. Sin embargo, aproximadamente el 80% presenta un bajo potencial de malignización.²⁷

Adenoma tubular

Contienen menos de un 25% de tejido veloso y son los más frecuentes ya que suponen el 85% de los pólipos neoplásicos. Son mayoritariamente pediculados y con una superficie lisa y lobulada.

Se localizan más frecuentemente en el colon distal y el recto. En el 50% de los casos los adenomas tubulares esporádicos son únicos y en el 30-40% de los casos existen dos o más lesiones.¹³

El riesgo de transformación maligna en los adenomas tubulares es bajo, 2-3%.²⁸

Adenoma veloso

Están formados por un 75-100% de tejido veloso. Son los menos frecuentes, representan el 5% de los adenomas. Son típicamente sésiles y con una superficie lanuda. En el 75% de los casos se localizan en recto y unión recto-sigma. Su tamaño oscila entre 1 y 10 cm de diámetro.¹³

El riesgo de transformación maligna es alto, 15-25%, son lesiones claramente premalignas.²⁸

Adenoma tubulovelloso

Contienen entre un 25% y un 75% de tejido veloso y suponen el 10% de los adenomas.

Presenta características de los adenomas tubulares y vellosos. La distribución de estas lesiones en el colon es la misma que la de los adenomas tubulares y su diámetro oscila entre 0,5 y 5 cm.¹³

2.2.3. Lesiones mesenquimales

Lipoma

El lipoma es el segundo tumor benigno más común después del pólipo adenomatoso, y es el tumor intramural más frecuente. Es una formación bien diferenciada que surge de depósitos de tejido conectivo adiposo en la pared intestinal.

Las localizaciones más comunes son el esófago, estomago intestino delgado y colon derecho.²⁶

Leiomioma

Los leiomiomas son tumores benignos que se originan en las células del músculo liso que forman parte de la pared del tubo digestivo. Pueden ser pedunculados o sésiles. Son más comunes en el estómago, y solo el 3% ocurren en el colon.²⁹

Si el grado mitótico es alto, o la lesión es mayor de 2,5 cm de diámetro pueden ser malignos.²⁶

Angioma

a. Hemangioma

El hemangioma es un tumor benigno de vasos sanguíneos, originado por la proliferación de las células que forman los vasos. En el colon y recto son poco frecuentes y surgen del plexo vascular submucoso. En estas localizaciones pueden ser de dos tipos: hemangiomas capilares y hemangiomas cavernosos. Estos últimos son más frecuentes y se caracterizan por canales vasculares grandes y dilatados, de paredes vasculares muy delgadas y con un gran potencial de crecimiento, lo que los hace verdaderas neoplasias.³⁰

b. Linfangioma

El linfangioma es una neoplasia benigna rara. Los de tipo intrabdominal son aun menos frecuentes, presentando una incidencia de 1 cada 160.000 individuos.³¹

Se localizan en el mesenterio del intestino delgado y colon, aunque también pueden tener localización retroperitoneal.³²

2.3 MORFOLOGÍA E HISTOLOGÍA DE CARCINOMAS EN COLON Y RECTO

La OMS define el carcinoma como un tumor epitelial maligno que penetra en la submucosa a través de la *muscularis mucosae*. La clasificación histológica establecida por la OMS³³ se presenta en la tabla IV.

Tabla IV: Clasificación de los carcinomas de colon y recto según la OMS.³³

| Carcinomas de colon y recto |
|--------------------------------------|
| 2.3.1 Adenocarcinoma |
| 2.3.2 Carcinoma medular |
| 2.3.3 Adenocarcinoma mucinoso |
| 2.3.4 Carcinoma en anillo de sello |
| 2.3.5 Carcinoma de células escamosas |
| 2.3.6 Carcinoma adenoescamoso |
| 2.3.7 Carcinoma de células pequeñas |
| 2.3.8 Carcinoma indiferenciado |

2.3.1 Adenocarcinoma

El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente, representa el 90-95% de todos los tumores de intestino grueso. Es un tumor maligno del epitelio glandular compuesto por estructuras tubulares y/o vellosas. Se limitan al epitelio o solo invaden la lámina propia.³⁴

2.3.2 Carcinoma medular

El carcinoma medular es un tipo de carcinoma no formador de glándulas, formado por células tumorales poligonales y linfocitos infiltrantes. Está altamente relacionado con una replicación del ADN (Acido Desoxirribonucleico) alterada y MSI de alto grado (MSI-H), características moleculares asociadas a un mejor pronóstico.³⁴

2.3.3 Adenocarcinoma mucinoso

El carcinoma mucinoso representa aproximadamente el 11%³⁵ y se caracteriza por acumulaciones de mucina extracelular retenida en el interior del tumor, más del 50% de la lesión está formada por mucina. Cursa frecuentemente con MSI, lo que le ofrece un pronóstico favorable.³⁶

2.3.4 Carcinoma en anillo de sello

El carcinoma en anillo de sello es uno de los tipos histológicos menos frecuente (1,2%).³⁷ Tiene más del 50% de las células tumorales con abundante mucina intracitoplásmica. Estas células también pueden aparecer en los pools de mucina de los adenocarcinomas mucinosos o en procesos infiltrantes con poca mucina extracelular.³⁸

2.3.5 Carcinoma de células escamosas

Los carcinomas escamosos y adenoescamosos son poco comunes en el intestino grueso, representan del 0,05% al 0,01% de los tumores. El carcinoma escamoso es un tumor maligno derivado de las células epiteliales no glandulares.³⁹

2.3.6 Carcinoma adenoescamoso

El carcinoma adenoescamoso es un tumor muy agresivo que presenta características del carcinoma escamoso y del adenocarcinoma, como áreas separadas en el tumor o mezcladas.⁴⁰

2.3.7 Carcinoma de células pequeñas

El carcinoma de células pequeñas es un tumor neuroendocrino de origen endodérmico. Son poco frecuentes, sólo un 0,3% de los cánceres colorrectales son del tipo neuroendocrino.⁴¹ Suelen ser tumores poco diferenciados y de especial agresividad en su comportamiento clínico. Tienen mal pronóstico, con tendencia a la rápida metastatización.⁴²

2.3.8 Carcinoma indiferenciado

El carcinoma indiferenciado es un tipo de tumor raro que carece de diferenciación morfológica más allá de la propiamente epitelial, sin diferenciación glandular, escamosa, ni neuroendocrina. A pesar de esto, son genéticamente diferentes y se asocian normalmente con MSI-H.⁴³

3. FACTORES DE RIESGO

El CCR depende en gran medida de factores ambientales, como queda de manifiesto en las frecuencias de aparición observadas en diferentes países y por los acusados números de casos entre poblaciones que han emigrado desde áreas de baja incidencia a otras de mayor riesgo.⁴⁴

Basándose en estudios epidemiológicos, se ha estimado que hasta un 70-80% del CCR podría ser atribuido a factores dietéticos, ambientales y/o relacionados con el estilo de vida. Además de estos factores, la susceptibilidad genética del individuo juega un papel decisivo a través de su interacción con el resto de factores etiológicos implicados.^{45,46} Los principales factores de riesgo asociados a CCR se describen en la tabla V.

TablaV: Factores de riesgo asociados a CCR.

| Factores de riesgo en CCR |
|--|
| 3.1. DIETA |
| 3.1.1 Fibra |
| 3.1.2 Grasas |
| 3.1.3 Carne Roja |
| 3.2. MICRONUTRIENTES |
| 3.2.1 Lácteos y calcio |
| 3.2.2 Selenio |
| 3.2.3 Acido Fólico |
| 3.3. ESTILO DE VIDA |
| 3.3.1 Actividad física y obesidad |
| 3.3.2 Alcohol |
| 3.3.3 Tabaco |
| 3.4. FARMACOS |
| 3.4.1 Terapia hormonal sustitutiva |
| 3.4.2 Antiinflamatorios no esteroideos |
| 3.5. EDAD |
| 3.6. ENFERMEDAD INTESTINAL INFLAMATORIA |
| 3.6.1 Enfermedad de Crohn |
| 3.6.2 Colitis ulcerosa |

3.1 DIETA

3.1.1 Fibra

Numerosos estudios han relacionado la ingesta de fibra con una disminución del riesgo de CCR.

La fibra es uno de los factores más importantes y de mayor controversia en la prevención del CCR. Según el mecanismo biológico que defiende esta hipótesis, la fibra aumenta el peso de las deposiciones, reduce el tránsito intestinal, diluye el contenido colónico y estimula la fermentación anaerobia bacteriana. Este proceso reduce el contacto entre el contenido intestinal y la mucosa y favorece la producción de ácidos grasos de cadena corta, acetato, propionato y butirato, lo cual reduce el pH.⁴⁷

Los datos que más apoyan la hipótesis de la acción protectora de la fibra provienen de estudios epidemiológicos en poblaciones con consumos de grandes cantidades de fibra, que muestran un efecto protector.⁴⁸ Según el trabajo de Bingham y cols. el riesgo relativo (RR) de desarrollar cáncer de colon fue de 0,58 (intervalo de confianza, IC, del 95%=0,45-0,85) para aquellas personas que consumieron elevadas cantidades de fibra en su dieta,⁴⁷ que es un riesgo bajo con respecto a las que no lo toman. Sin embargo varios estudios como el publicado por Alberts y cols., en el que se incluyeron más de 8.000 casos, no pudo demostrar este efecto beneficioso.⁴⁹

Una explicación de los distintos resultados publicados podría ser que aunque la cantidad de fibra sea la misma en las cohortes analizadas, la composición de esta puede ser muy diferente, fibra soluble o no soluble, de origen cereal, frutas o vegetales.⁵⁰

En la actualidad se recomienda mantener una dieta rica en frutas y vegetales en espera de que los estudios actualmente en marcha aporten nueva evidencia.⁵¹

3.1.2 Grasas

Existen resultados contradictorios sobre el efecto de la ingesta de grasas y el riesgo de cáncer en colon y recto.

El mecanismo propuesto para explicar la relación con el aumento de riesgo se basa en la asociación entre la ingesta de grasa y la producción de sales biliares. Los ácidos biliares primarios o conjugados son producidos por el hígado para la absorción de lípidos provenientes de la dieta en el intestino delgado. Un pequeño porcentaje, 1-2%, no es reabsorbido en el íleon y acceden al colon, donde son convertidos por la microflora intestinal en ácidos biliares secundarios que presentan propiedades mutagénicas.⁵² Los ácidos biliares pueden inducir una hiperproliferación de la mucosa intestinal y activan el factor de transcripción AP-1 asociado con la transformación neoplásica en las células del colon.⁵³

Jarvinen y cols. observaron que la ingesta de grasas saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas, no está significativamente asociada con el riesgo de CCR, mientras que un alto consumo de colesterol sí puede aumentar este riesgo. El riesgo de CCR en las personas que consumían mayor cantidad de colesterol en la dieta era 3,26 veces mayor (IC95%=1,54-6,88).⁵⁴ La guía de práctica clínica de prevención del CCR tampoco encuentra asociación entre la dieta baja en grasas y la reducción de riesgo del CCR en población de riesgo medio ni de riesgo elevado.⁵¹

3.1.3 Carne roja

El consumo de altas cantidades de carne roja se asocia con un riesgo aumentado de CCR.

La preparación de la carne roja a alta temperatura podría favorecer la aparición de distintas sustancias mutagénicas como aminas heterocíclicas o hidrocarburos aromáticos policíclicos en la superficie de la carne cocinada durante largos periodos de tiempo o en contacto directo con el fuego.^{55,56} Otra posible explicación es que personas con un genotipo acetilador rápido sean más susceptibles a estos carcinógenos de la carne.⁵⁷

Numerosas publicaciones relacionan las dietas ricas en carnes rojas (ovino, bovino y porcino) con un incremento del riesgo de CCR, siendo el riesgo relativo de 1,35 (IC95%=1,21-1,51), e incluso mayor con el consumo de carne procesada (curada, salada, adobada o ahumada).^{58,59}

Este aumento no se ha evidenciado con otras fuentes de proteínas de origen animal distintas a la carne roja, como los derivados lácteos, el pescado y las carnes magras (pollo, conejo, pavo).^{51,60}

3.2 MICRONUTRIENTES

3.2.1 Calcio y lácteos

Se ha propuesto que los suplementos de calcio tienen un efecto protector sobre el desarrollo de CCR y que el consumo de altas cantidades de lácteos reduce el riesgo de padecer cáncer de colon.

El calcio puede alterar la proliferación de la mucosa del colon, es capaz de capturar los ácidos biliares en la luz intestinal mediante su unión a éstos; evitando así las consecuencias de las altas concentraciones de los ácidos biliares en el intestino.⁶¹

En algunos ensayos clínicos se ha evidenciado una disminución de la recurrencia de adenomas relacionada con la ingesta de mayores cantidades de calcio, aunque estos datos no se han confirmado en todos los estudios por lo que actualmente no se recomienda el uso rutinario de suplementos de calcio.⁵¹

El consumo de lactosa puede favorecer el crecimiento de las bacterias de ácido láctico, que tienen propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas. La lactosa no hidrolizada parece generar alteraciones beneficiosas similares a las de otros prebióticos fermentados por la microflora colónica.⁶²

Un estudio reciente observó un riesgo relativo de desarrollo de cáncer de colon para altos consumos de lácteos de 0,78 (IC95%= 0,67-0,92) sin embargo el consumo de lácteos no se relacionó con el riesgo de cáncer rectal.⁶³

3.2.2 Selenio

El selenio es un elemento traza que se encuentra en cereales, carne y pescado. El consumo de selenio en bajas cantidades se ha relacionado con la presencia de adenomas.⁶⁴

Existe cierta controversia sobre la influencia del selenio en el riesgo de desarrollar CCR. Un estudio reciente observó un descenso del riesgo en CCR cuando los niveles altos de selenio en suero se acompañan de niveles altos de folato. Tanto el selenio como el folato participan en la metilación del ADN; el selenio como receptor y el folato como donador de grupos metilo. La deficiencia de ambas sustancias provoca una hipometilación en el ADN y por lo tanto aumenta la susceptibilidad al cáncer.⁶⁵

3.2.3 Ácido Fólico

El folato es un agente potencialmente protector.

Los mecanismos que median estos efectos protectores no se conocen, pero se sabe que el ácido fólico actúa como donante de grupos metilo, que son necesarios para la formación, metilación, reparación y traducción del ADN; así como para la formación y funcionamiento de proteínas; además de presentar un posible efecto directo reduciendo la proliferación mucosa.^{66,67}

Varios estudios epidemiológicos revelan que los suplementos de folato disminuyen el riesgo de CCR. En el *National Health and Nutrition Examination Survey*, un estudio prospectivo que incluye a más de 14.000 individuos, se apreció una disminución del 60% del riesgo de cáncer de colon en el grupo con alta ingesta de folato.⁶¹

La baja ingesta de folato está relacionada con un aumento en el riesgo de CCR, especialmente en sujetos con consumos elevados de alcohol y escasa ingesta de proteínas.⁶⁸

Además, los niveles de folato son un importante determinante del riesgo de neoplasia en pacientes con CU. Se ha descrito una relación inversa entre los niveles de folato intraeritrocitario y la aparición de displasia colorrectal, y también un menor riesgo de aparición de displasia en pacientes a los que se les administran suplementos de ácido fólico.⁶⁹

3.3 ESTILO DE VIDA

3.3.1 Actividad física y obesidad

El análisis de estudios observacionales estima que el ejercicio físico regular reduce el riesgo de CCR alrededor de un 40%.⁵¹

Además, se ha visto que los individuos físicamente más activos, que realizan una actividad física durante largos periodos de tiempo, presentan un menor riesgo de cáncer de colon, con una reducción de la incidencia de CCR hasta de un 50%.^{70,71}

En cuanto a la obesidad, diversos estudios epidemiológicos encuentran una relación clara entre sobrepeso y obesidad y el riesgo de cáncer de colon, aunque no de recto, en hombres. Esta asociación es más pronunciada en personas con escasa actividad física.⁷²

La obesidad se asocia a un aumento del riesgo de CCR, principalmente en el caso de la obesidad troncular, que se asocia a un incremento del riesgo independientemente del índice de masa corporal. La resistencia a la insulina y el hiperinsulinismo parecen ser el vínculo entre la obesidad y el aumento de riesgo de cáncer.^{51,73}

3.3.2 Alcohol

El consumo diario del alcohol duplica el riesgo en el CCR.⁷⁴

El consumo excesivo de alcohol es un factor de riesgo, tanto en hombres como en mujeres, en el desarrollo de CCR. Un análisis conjunto de 8 estudios de cohortes de 5 países mostró que el riesgo estaba aumentado a partir de un consumo de 30 gramos de alcohol por día, y era independiente del tipo de bebida consumida.⁷⁵

3.3.3 Tabaco

Existe asociación entre el tabaquismo, los adenomas colorrectales y el CCR.

La asociación depende del número de cigarrillos consumidos, del tiempo de exposición del tabaco y de la edad a la que se empieza a fumar. La exposición de productos derivados del tabaco de forma temprana se asocia con un riesgo aumentado para el desarrollo de CCR, apareciendo la relación con el cáncer de colon tras un largo periodo de tiempo de exposición continuada.^{76,77}

3.4 FARMACOS

3.4.1 Terapia hormonal sustitutiva

El uso de hormonas posmenopáusicas se relaciona con un descenso en el riesgo de CCR.⁷⁸

Los anticonceptivos orales (ACO) se asocian con una reducción en el riesgo de padecer CCR. El riesgo relativo de CCR en mujeres que usan ACO frente a mujeres que nunca los han usado es de 0,81 (IC95% = 0,72-0,92).⁷⁹

La terapia hormonal sustitutiva compuesta por estrógenos o la asociación de estrógenos y diversos progestágenos ha demostrado en varios estudios una reducción de

la incidencia de CCR. Esto se basa en la teoría de que los estrógenos protegen frente a la MSI, y la falta de estrógenos aumenta el riesgo de MSI.⁸⁰

Sin embargo en la actualidad no se recomienda su uso con este fin debido a que estos beneficios son superados por una alta incidencia de efectos adversos graves tales como el incremento del riesgo de cáncer de mama.⁵¹

3.4.2 Antiinflamatorios no esteroideos

El uso regular de fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE) confieren un riesgo más bajo de CCR.

Los AINE constituyen el grupo farmacológico que mayor interés ha despertado en la prevención del CCR. En las últimas décadas numerosos estudios observacionales han demostrado un efecto protector, con una reducción del riesgo de CCR entre los pacientes en tratamiento crónico con ácido acetilsalicílico ($RR=0,56$; $IC_{95\%}=0,36-0,9$; $p=0,008$).⁸¹

Su efecto antineoplásico está mediado a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, cuya inhibición disminuye la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Los tumores colorrectales contienen altas cantidades de prostaglandinas E2, compuestos que parecen tener gran influencia en la carcinogénesis.⁸²

Ensayos clínicos aleatorizados han demostrado de forma consistente una regresión, a corto plazo, de adenomas colorrectales en pacientes con poliposis adenomatosa familiar tratados con sulindaco o celecoxib, pero no son válidos para su eliminación o prevención.⁵¹

La administración de AINEs se asocia con efectos secundarios cardiovasculares, gastrointestinales y renales, por lo que no se aconseja su administración sistemática para la prevención del CCR.⁵¹

3.5 EDAD

La edad es el factor de riesgo más relevante que afecta al CCR en la mayoría de la población.

El mayor grupo de riesgo lo forman las personas mayores de 40 años, ya que menos de un 10% de CCR se producen en pacientes menores de 40 años. El aumento de la incidencia se da a partir de los 65-70 años.^{83,84}

Los individuos mayores de 65 años presentan un aumento de incidencia del CCR de 2,5 veces con respecto a los menores de esta edad. En el caso de la mortalidad por CCR el número de fallecimientos aumenta unas 4 veces al superar los 65 años.²

3.6 ENFERMEDAD INTESTINAL INFLAMATORIA

El riesgo de CCR está directamente relacionado con el proceso inflamatorio. La inflamación persistente que se produce en el colon en pacientes con CU y CD parece ser la causa de que estos pacientes tengan un mayor riesgo de padecer CCR,⁸⁵ ya que esta inflamación parece derivar en proliferación celular, aumento de estrés oxidativo y en última instancia desarrollo de displasia.⁸⁶

El mecanismo exacto por el que una inflamación crónica deriva en carcinogénesis no está claro, pero se postula que las mutaciones responsables puedan ser las mismas que se producen en el CCR esporádico.⁸⁵

3.6.1 Colitis ulcerosa

La CU es una enfermedad inflamatoria intestinal que afecta la mucosa del intestino grueso o colon de forma difusa y continua, y no afecta otros tramos del aparato gastrointestinal.

La duración media desde el diagnóstico de CU al desarrollo de CCR es de 17 años, con una edad media de diagnóstico de CCR de 51 años en hombres y de 54 años en mujeres.⁸⁷ Debido a esto los pacientes con CU de larga duración deben estar sometidos a una gran vigilancia, especialmente si se observa pancolitis. En un 10-20% de los casos de CU se observan cánceres sincrónicos.⁸⁸

Un metanálisis realizado por Eaden y cols., que incluía 16 estudios, calcula un riesgo acumulado de CCR en CU del 8,3% a los 20 años y de 18,4% a los 30 años.⁸⁹

El RR en los pacientes con solo proctitis es de 1,7 (IC, 4,6-7,0), los pacientes con colitis izquierda tienen un RR de 2,8 (IC, 1,6-4,4) y los pacientes con pancolitis tienen el mayor RR que se sitúa en 14,8 (IC, 11,4-18,9).⁹⁰

3.6.2 Enfermedad de Crohn

Es una enfermedad inflamatoria intestinal que puede afectar todo el grosor de la pared intestinal y que puede aparecer de manera simultánea en varios segmentos del aparato gastrointestinal. Las zonas más frecuentemente implicadas son el íleon y el ciego.

El RR para la afectación ileocólica es de 3,2, y para la afectación colónica de 5,6. Si la aparición de la CD con afectación colónica ocurre antes de los 30 años, el RR aumenta hasta 20,9.⁹¹

4. ETIOPATOGENIA

4.1 CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES COLORRECTALES

Los tumores colorrectales son un excelente modelo para estudiar la carcinogénesis, así como los eventos moleculares involucrados en el desarrollo de un tumor. Gracias a la gran cantidad de información clínica e histopatológica referente a los tumores colorrectales malignos se sabe que tanto el factor hereditario como el ambiental contribuyen al desarrollo del CCR, lo que permite el estudio de las alteraciones genéticas tanto somáticas como heredadas.

Atendiendo a su forma de transmisión, se conocen tres formas fundamentales de cáncer colorrectal:⁹²⁻⁹⁴

1. La forma esporádica que incluye tanto a los cánceres que aparecen en personas que no portan una mutación que les confiera susceptibilidad al tumor como a los cánceres que ocurren en personas que no tienen historia familiar de neoplasia. La mayoría de los CCR, 85%, se clasifican como esporádicos.
2. La familiar, en la cual no se ha encontrado ningún gen asociado, aunque los estudios poblacionales indican un riesgo 2 o 3 veces superior de padecer CCR cuando los familiares de primera consanguinidad ha padecido un cáncer esporádico de colon. El 10-20% de todos los CCR son de origen familiar.

3. La forma hereditaria que incluye dos de los CCR más conocidos, poliposis familiar adenomatosa (FAP) y síndrome de Lynch, aunque existen otros síndromes asociados a la predisposición a padecerlos. Es la forma menos común de CCR.

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) los principales síndromes genéticos asociados al CCR se pueden clasificar en síndromes hereditarios principales y síndromes raros⁹⁴ (Tabla VI).

TablaVI: Principales síndromes genéticos asociados al CCR.

| Síndromes Hereditarios principales |
|--|
| Poliposis familiar adenomatosa |
| Poliposis familiar adenomatosa atenuada (AFAP) |
| Neoplasia asociada al gen <i>MYH</i> * |
| Síndrome de Lynch |
| Cáncer colorrectal familiar (FCC) |
| Síndromes raros |
| Peutz-Jeghers |
| Poliposis juvenil |
| Poliposis hiperplásica (HPS) |

*Homologo humano del gen *MutY* de E.Coli.

El riesgo de desarrollar CCR en los portadores de las diferentes mutaciones asociadas a estos síndromes es variable⁹⁴ (TablaVII).

Tabla VII: Riesgo de CCR relacionado con los diversos síndromes genéticos asociados al CCR.

| Síndrome | Riesgo absoluto en portadores de la mutación. |
|---------------------------------|---|
| FAP | 90% a los 45 años |
| AFAP | 69% a los 80 años |
| Lynch | 80% a los 75 años |
| Neoplasia asociada a <i>MYH</i> | No establecido |
| Peutz-Jeghers | 39% a los 70 años |
| Poliposis Juvenil | 17% a 68% a los 60 años |

4.2 SÍNDROMES HEREDITARIOS QUE PREDISPONEN AL CCR

Poliposis Adenomatosa Familiar

Es un síndrome autosómico dominante con una incidencia en la población que varía entre 1 de cada 7.000 y 1 de cada 20.000 nacidos.⁹⁵ Aproximadamente el 1% de todas las formas de CCR son FAP.

Se caracteriza por la aparición de múltiples pólipos adenomatosos, más de 100, en el colon y el recto y por una edad promedio de debut de 39 años. Los pólipos aparecen mayoritariamente en el colon izquierdo y en el recto. Algunas variantes incluyen pólipos en el tracto gastrointestinal superior, así como manifestaciones extraintestinales, pueden aparecer tumores en otras localizaciones incluyendo el cerebro y la tiroides. Los pólipos gástricos aparecen en el 60% de los pacientes con FAP, mientras que los adenomas en el duodeno tienen una incidencia del 80-100% en estos pacientes. La incidencia de estas poliposis está muy aumentada si se compara con la de

la población general que es de 0,8-1,9% para los pólipos gástricos y de 0,4% para los adenomas de duodeno.⁹⁶

Esta enfermedad se presenta típicamente con CCR a edades precoces de manera secundaria a la poliposis adenomatosa extensa en el colon.⁹⁷

El gen *APC* está localizado en el cromosoma 5q21, aparece mutado en la mayoría de los casos de FAP. Los individuos que heredan una mutación en el gen *APC* tienen un alto riesgo de desarrollar adenomas en el colon.^{98,99} La edad de aparición de adenomas en el colon es variable, a los 10 años solo el 15% de los portadores de la mutación desarrollan adenomas, mientras que a los 20 años el porcentaje aumenta hasta el 70% y a los 30 años hasta el 90%.⁹⁹

La mayoría de los individuos que sufren FAP tiene historia familiar de CCR, sin embargo un 25-30% de ellos son portadores de mutaciones de nueva aparición, sin evidencia clínica o genética de FAP en la familia.¹⁰⁰

La aparición de CCR y cánceres en el sistema nervioso central se denomina síndrome de Turcot. Es un síndrome molecularmente heterogéneo en el que la poliposis del colon y el meduloblastoma se asocian con mutaciones en *APC*, mientras que el cáncer de colon y el glioblastoma se asocian con mutaciones en los genes reparadores del ADN (MMR).¹⁰¹

El síndrome de Gardner es una variante fenotípica de la FAP en el que aparecen quistes epidermoides en la piel, osteomas mandibulares, fibromas y tumores desmoides.¹⁰²

Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada

Es un síndrome heterogéneo caracterizado por una presencia menor de pólipos en el colon y el recto que en FAP. La edad media de aparición son los 56 años, posterior que la FAP clásica. Se ha calculado una media de 30 pólipos para la AFAP, pero con un rango muy amplio.^{103,104}

Los adenomas, a diferencia que en la FAP, pueden ser planos y aparecen predominantemente en el colon derecho.¹⁰⁵

La AFAP se asocia con mutaciones concretas del gen *APC* y se han descrito 3 grupos de mutaciones específicas relacionadas con AFAP: ^{103,106}

- Mutaciones localizadas en el extremo 5' y en el exón 4 relacionadas con la aparición de 2 a más de 500 adenomas tanto en colon y recto como en el tracto gastrointestinal superior.
- Fenotipos asociados al exón 9 en los que aparecen de 1 a 150 adenomas solo en colon y recto.
- Mutaciones en la región 3' asociadas menos de 50 adenomas.

Neoplasia asociada a *MYH*

Es un síndrome autosómico recesivo en el que las mutaciones en homocigosis del gen *MYH*, localizado en el cromosoma 1p32-34, se asocian con un fenotipo de múltiples adenomas colorrectales, con o sin desarrollo de CCR. Estas mutaciones justifican una proporción de enfermos con FAP sin mutación patogénica de *APC*.^{107,108}

Varios estudios estiman una proporción de entre 7% y 17% de pacientes con fenotipo FAP, sin mutaciones en *APC* y con mutaciones en ambos alelos de *MYH*.¹⁰⁹

El número de adenomas varía desde 5 hasta 700, con una media de 50 pólipos, que aparecen principalmente en el colon izquierdo. El 24% de los pacientes presentan CCR en el momento del diagnóstico.¹¹⁰ El riesgo de CCR a los 60 años es cercano al 100%.¹¹¹

El RR para las mutaciones monoalélicas es bajo, 1,27 (IC95%=1,01-1,61), mientras que para las mutaciones bialélicas es de 117 (IC95%=74-184).¹¹²

Síndrome de Lynch

El síndrome de Lynch explica del 3 al 5% de todos los CCR. Se le denomina también cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) y síndrome de cáncer familiar. Este síndrome no se caracteriza por un gran número de pólipos, presenta adenomas solo ocasionalmente y son de mayor tamaño y más vellosos que en la FAP.^{113,114} La frecuencia de aparición varía entre 1 de cada 2000 y 1 de cada 200 individuos.¹¹⁵

Es un síndrome autosómico dominante causado por la mutación de uno o varios MMR, principalmente *hMLH1* y *hMSH2*, y por la MSI que está presente en más del 90% de los casos de HPNCC.¹¹⁵

La edad media de aparición de CCR en los portadores de mutaciones para el síndrome de Lynch es de 44 años, aunque si la mutación aparece en el gen reparador *hMSH6* la edad media aumenta hasta los 55-57 años.¹¹⁶ Además, se observa una rápida progresión adenoma-carcinoma.

Estos pacientes pueden padecer cánceres sincrónicos y metacrónicos y tienen un mayor riesgo de padecer otros tipos de tumores, siendo el adenocarcinoma endometrial el más común entre la población femenina, ya que aparece en el 50% de las familias que sufren síndrome de Lynch.¹¹⁷

Un metanálisis recientemente realizado por Chen y cols. observa diferentes riesgos de desarrollar CCR en los pacientes que padecen síndrome de Lynch, dependiendo de los genes mutados. El riesgo de CCR cuando las mutaciones aparecen en los genes *hMLH1* o *hMSH2* es del 60% en hombres y del 30% en mujeres, pero si la mutación ocurre en *hMSH6* el riesgo es de 30% tanto para hombres como para mujeres.¹¹⁸

El Grupo de Colaboración Internacional en HNPCC elaboró los criterios que definen al HNPCC y que permiten discriminar entre la agregación familiar del CCR y el patrón hereditario. Los criterios diagnósticos (Ámsterdam I y II) que definen el HNPCC

son: que al menos 3 familiares de dos generaciones sucesivas deben presentar un cáncer asociado al HNPCC (CCR, intestino delgado, endometrio, ovario, páncreas, tracto hepatobiliar, estómago, uréter, pelvis renal) y en al menos uno de los casos, la edad de diagnóstico debe ser inferior a 50 años.^{119,120}

Una variante del HPNCC es el síndrome de Muir-Torre que presenta adenomas sebáceos, epitelomas sebáceos y tumores en todo el intestino, estómago, endometrio, hígado y ovarios.¹¹⁵ Las mutaciones asociadas a este síndrome aparecen en los genes *hMLH1* y *hMSH2*.¹²¹

Cáncer Colorrectal Familiar

El FCC se presenta mediante una herencia autosómica dominante para adenomas y cánceres en las familias que padecen este síndrome.¹²²

Los tumores de las familias con FCC suelen cursar con estabilidad de microsatélites (MSS) y se asocian con mutaciones en 9q22.2-31.2.¹²³ Se han identificado varios polimorfismos de una base (SNP) cercanos a esta región del cromosoma 9q. El grupo de Gray-McGuire propone una asociación entre el haplotipo generado con estos SNPs y el FCC.¹²⁴

La incidencia de CCR a los 35-40 años en estas familias se corresponden con el riesgo de padecer CCR a los 50 años en una persona sin historia familiar.¹²⁵

Los grupos familiares de CCR explican aproximadamente el 20% de todos los CCR en los países desarrollados.¹²⁶

4.3 SÍNDROMES RAROS ASOCIADOS AL CCR

Síndrome Peutz-Jeghers

El PJS es un desorden autosómico dominante de aparición temprana caracterizado por la presencia de máculas melanocíticas en los labios y en las regiones peribucales y por la aparición de múltiples pólipos gastrointestinales tanto hamartomatosos como adenomatosos. Aproximadamente la mitad de los casos aparecen ligados a mutaciones en el gen que codifica para la serina treonina quinasa STK11, situado en el cromosoma 19p13.3.^{127,128}

Estos pacientes tienen un riesgo aumentado de padecer CCR y otros tumores en localizaciones como el páncreas, estómago, mamas, ovarios, testículos y cervix.¹²⁹

Un estudio realizado en 419 pacientes con PJS, 297 de los cuales tenían la mutación STK11/LKB1, señala que el 85% de los individuos desarrollan cáncer a los 70 años.⁹⁴

Síndrome de Poliposis Juvenil

El JPS es una enfermedad autosómica dominante cuya aparición ocurre en la infancia. Es genéticamente heterogénea y se caracteriza por la presencia de pólipos

hamartomatosos a lo largo del tracto gastrointestinal.¹³⁰ El número de pólipos varía de 5 hasta 200.

Se asocia con mutaciones germinales en el gen *MADH4* localizado en el cromosoma 18q21 en el 15-20% de los casos y con mutaciones en el gen *BMPRIA*, localizado en 10q22 y que codifica para el receptor 1A de la proteína morfogénica ósea, en el 25-40% de los casos.^{131,132}

El riesgo a padecer CCR en este síndrome es del 39%.¹³³

Poliposis Hiperplásica

La HPS se estima que afecta a 1 de cada 2000 individuos, haciéndola más frecuente que la FAP.¹³⁴

No se conoce susceptibilidad genética ni regiones genómicas asociadas a esta patología, por lo que los criterios diagnósticos se basan en consensos de expertos indicados por la OMS.

Según la OMS este síndrome se define por:¹³⁵

- Presencia de un mínimo de 5 pólipos hiperplásicos próximos al colon sigmoide y al menos 2 de los pólipos deben medir más de 10 mm de diámetro.
- Un pólipo hiperplásico próximo al colon sigmoide en un individuo con al menos un familiar de primer grado que padezca poliposis hiperplásica.

- Más de 30 pólipos hiperplásicos distribuidos a lo largo del colon.

La mayoría de los casos de HPS poseen historia familiar de pólipos hiperplásicos, y aproximadamente la mitad de los casos tienen historia familiar positiva de CCR.¹³⁶

La prevalencia del carcinoma colorrectal en estos pacientes es del 50%.¹³⁷

5. FACTORES PRONÓSTICO

El estudio correcto de los pacientes diagnosticados de CCR exige una evaluación completa de los factores pronósticos conocidos de esta enfermedad. Los factores pronóstico se obtienen a partir de la recogida prospectiva de distintos datos clínico-patológicos validados por estudios multivariantes proporcionándonos una información esencial para conocer el curso clínico probable del tumor en cada caso concreto y realizar el tratamiento más adecuado.

Entre los factores pronóstico, el factor cirujano es considerado como una variable independiente. Por tanto, con la finalidad de evitar sesgos importantes en el pronóstico todas las cirugías de este trabajo han sido llevadas a cabo por un mismo cirujano. De modo semejante, la estadificación patológica postoperatoria viene condicionada por la calidad del estudio anatomopatológico, que en este caso se realiza por 2 anatomopatólogos diferentes.

El Comité Americano del Cáncer (AJCC), basándose en la clasificación recomendada por el Colegio de Patólogos Americanos (CAP), ha evaluado los factores pronóstico en el CCR con la finalidad de poder identificar aquellas características tumorales con repercusión clínica (Tabla VIII). La séptima y última revisión del AJCC fue publicada en el año 2009.¹³⁸

Tabla VIII: Factores pronóstico definidos por la AJCC.

| Factores pronóstico |
|-------------------------------------|
| 5.1 Estadio tumoral |
| 5.2 Tipo histológico |
| 5.3 Grado de diferenciación tumoral |
| 5.4 Factores séricos |
| 5.5 Factores moleculares |

Existen otros factores derivados del examen patológico, con valor pronóstico demostrado, que no recogen estas clasificaciones como la localización del tumor y que también han sido analizados en este trabajo. Diversos estudios en los últimos años observan diferencias entre los tumores localizados en el colon derecho y los localizados en el colon izquierdo. Un estudio retrospectivo de pacientes operados de CCR primario del *Surveillance, Epidemiology and End Results Program* han observado que los tumores situados en el colon derecho tienen peor pronóstico que los situados en el colon izquierdo. Los tumores de colon derecho presentan un riesgo de mortalidad un 5% superior que los localizados en el colon izquierdo.¹³⁹ Estos datos son apoyados por el estudio multicéntrico alemán *Colon/Rectum Cancer*, que también observa un peor pronóstico en los tumores situados en el colon derecho.¹⁴⁰

En este estudio se clasifican los tumores según su localización para su análisis pronóstico. Se diferencian las localizaciones de colon y recto y además, los tumores colónicos se agrupan en 2 categorías: proximal si se sitúan en colon ascendente o transversal y distal si se localizan en colon descendente o sigma.

5.1 ESTADIO TUMORAL

El estadio tumoral se define como el grado anatómico de la enfermedad en el momento del diagnóstico, codificado como la cantidad de tumor que está presente. El estadio es el factor pronóstico de más valor.

Las clasificaciones comúnmente utilizadas para definir el estadio de los tumores colorrectales son la clasificación de Dukes, la de Astler-Coller modificada y la clasificación propuesta por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y el AJCC.

En 1932, el patólogo inglés, Cuthbert Esquire Dukes clasificó a los tumores colorrectales en 3 grupos A, B y C según el grado de invasión tumoral.¹⁴¹ Posteriormente Kirkland, en 1949 modificó la clasificación anterior dividiendo el grupo B en B1 y B2 según la infiltración de la capa muscular.¹⁴²

En 1954 los americanos Astler y Coller, modificaron la clasificación de Dukes, incluyendo los tumores resecados con criterio paliativo, así el grado C lo dividieron en C1 y C2 según el grado de invasión de la pared intestinal y con ganglios invadidos.¹⁴³ En 1967 Turnbull añadió el estadio D que incluía los tumores con metástasis alejadas¹⁴⁴ (Tabla IX).

Tabla IX: Clasificación del estadio modificada.

| Estadio | Descripción anatomopatológica |
|----------------|--|
| A | Tumor que infiltra la mucosa |
| B1 | Tumor que alcanza la muscular sin atravesarla |
| B2 | Tumor que atraviesa la muscular pero sin afectación ganglionar |
| C1 | Tumor que no atraviesa la pared intestinal, pero tiene metástasis ganglionares |
| C2 | Tumor que atraviesa la pared intestinal y se acompaña de metástasis ganglionares |
| D | Metástasis a distancia |

Este sistema tiene una validez demostrada para predecir la supervivencia aunque la fiabilidad de predicción de muerte por cáncer colorrectal es sólo del 68 al 71%.¹⁴⁴

La clasificación TNM (Tumor-Ganglio-Metástasis) fue diseñada por Pierre Denoix en 1942 para clasificar el cáncer basándose en las principales características morfológicas de los tumores malignos que parecían influir en la enfermedad. En la clasificación TNM:

- T define la extensión local del tumor primario antes de ser tratado, en el momento del diagnóstico.
- N se refiere al estado metastásico de los ganglios regionales
- M se refiere a la enfermedad metastásica a distancia.
- El símbolo “c” se usa en la descripción clínica de T, N o M, mientras que “p” define la determinación patológica de T o N.

La clasificación clínica está basada en la evidencia adquirida del examen físico, la imagen radiológica, la endoscopia, la biopsia y la exploración quirúrgica. La clasificación patológica se basa en el examen macroscópico y microscópico de la pieza

reseccionada del tumor primario antes de que sea tratado. Las variables patológicas se consideran más exactas que las clínicas, y son las que definen la clasificación TNM.

En 1958 el UICC publicó la primera estadificación usando sistema TNM,¹⁴⁵ y en 1977 el AJCC publicó su primer manual de clasificación del cáncer basado en el sistema TNM.¹⁴⁶ Desde 1987 no existen diferencias entre UICC y AJCC. La séptima revisión estadifica los tumores colorrectales en cuatro estadios¹³⁸ (Tabla X) y las variables de la nomenclatura TNM adquieren diferentes valores según las características de invasión del tumor, del estado de invasión ganglionar y de la metástasis a distancia (Tabla XI).

Tabla X: Estadios definidos en la 7ª edición del manual de estadificación del cáncer de la AJCC.¹³⁸

| Estadio | T | N | M |
|-------------|-------------|-------------|-----|
| O | Tis | N0 | M0 |
| I | T1 | N0 | M0 |
| | T2 | N0 | M0 |
| IIA | T3 | N0 | M0 |
| IIB | T4a | N0 | M0 |
| IIC | T4b | N0 | M0 |
| IIIA | T1-T2 | N1 | M0 |
| | T1 | N2a | M0 |
| | T3-T4a | N1 | M0 |
| IIIB | T2-T3 | N2a | M0 |
| | T1-T2 | N2b | M0 |
| | T4a | N2a | M0 |
| IIIC | T3-T4a | N2b | M0 |
| | T4b | N1-N2 | M0 |
| IVa | Cualquier T | Cualquier N | M1a |
| IVb | Cualquier T | Cualquier N | M1b |

Tabla XI: Categorías de clasificación de la nomenclatura TNM.

| |
|---|
| Tumor Primario (T) |
| TX: No puede evaluarse el tumor primario. |
| T0: No hay indicación de tumor primario. |
| Tis: Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia. |
| T1: El tumor invade la submucosa. |
| T2: El tumor invade la <i>muscularis propria</i> . |
| T3: El tumor invade la subserosa o los tejidos pericólicos o perirrectales no peritonealizados a través de la <i>muscularis propria</i> . |
| T4a: El tumor invade el peritoneo visceral. |
| T4b: El tumor invade o perfora otros órganos o estructuras. |
| Ganglios linfáticos regionales (N) |
| NX: No pueden evaluarse los ganglios regionales. |
| N0: No hay metástasis de los ganglios linfáticos regionales. |
| N1: Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales. |
| N1a: Metástasis en 1 ganglio linfático regional. |
| N1b: Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales. |
| N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales. |
| N2a: Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales. |
| N2b: Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales. |
| Metástasis a distancia (M) |
| MX: No puede evaluarse la metástasis a distancia. |
| M0: No hay metástasis a distancia. |
| M1: Metástasis a distancia. |
| M1: Metástasis en un solo órgano. |
| M1b: Metástasis en más de un órgano. |

La mayoría de los tumores de este trabajo se han estadificado atendiendo a la clasificación modificada de Dukes y a la cuarta edición de la clasificación TNM publicada en 1997¹⁴⁷ (Tabla XII), ya que las cirugías se realizaron entre los años 1995 y 2003.

Tabla XII: Clasificación TNM 1997, 4ª edición y su equivalencia con la clasificación de Dukes.¹⁵³

| Estadio | T | N | M | Equivalencia Dukes |
|------------|-------------|-------------|----|--------------------|
| O | Tis | N0 | M0 | A |
| I | T1 | N0 | M0 | |
| | T2 | N0 | M0 | |
| II | T3 | N0 | M0 | B |
| | T4 | N0 | M0 | |
| III | Cualquier T | N1 | M0 | C |
| | Cualquier T | N2 | M0 | |
| IV | Cualquier T | Cualquier N | M1 | D |

El sistema TNM tiene una gran validez para predecir la supervivencia. La supervivencia a los 5 años de la detección del tumor asociada al estadio TNM se muestra en la tabla XIII.¹⁴⁸

Tabla XIII: Relación entre el estadio TNM y la supervivencia en CCR.

| Estadio TNM | Supervivencia a los 5 años (%) |
|------------------------|---------------------------------------|
| 0, I (Tis, T1; N0; M0) | >90 |
| I (T2; N0; M0) | 80–85 |
| II (T3, T4; N0; M0) | 70–75 |
| III (T2; N1–3; M0) | 70–75 |
| III (T3; N1–3; M0) | 50–65 |
| III (T4; N1–3; M0) | 25–45 |
| IV (M1) | <3 |

Independientemente de la clasificación usada en la estadificación tumoral, la supervivencia global (SG) es mayor en estadios precoces que en estadios avanzados. La supervivencia a los 5 años en estadios A y B es de 95-100% y 80-85% respectivamente, mientras que en los estadios avanzados es del 50-70% en estadio C y del 5-15% en tumores en estadio D.^{149,150}

MODIFICADORES DEL ESTADIO

Existen otros parámetros que definen el tumor colorrectal y que se pueden usar en combinación con la clasificación TNM.

Invasión linfática

Determina la invasión neoplásica de los conductos linfáticos

El tumor identificado dentro de los vasos linfáticos en cualquier parte de la pared colorrectal es un factor pronóstico adverso independiente.¹⁵¹ En el sistema de la AJCC se clasifica como presencia de invasión linfática (L1), o ausencia (L0).

Invasión venosa

Determina la invasión neoplásica de los conductos venosos.

La invasión venosa es también un factor pronóstico adverso independiente del estadio. La invasión venosa de localización extramural está asociada a un riesgo aumentado de metástasis hepáticas.¹⁵² La importancia de la invasión venosa intramural está menos definida.

En el sistema de la AJCC se clasifica como invasión venosa microscópica (V1), invasión venosa macroscópica (V2) o ausencia de invasión venosa (V0)

Invasión perineural

La invasión perineural es la capacidad de los tumores colorrectales para invadir el espacio perineural. En ocasiones, esta invasión alcanza hasta 10 cm más allá del tumor. Es un factor pronóstico adverso independiente del estadio y de la localización.

Esta característica se correlaciona con un aumento de recurrencia local, menos supervivencia y mayor probabilidad de metástasis en el momento de la cirugía.¹⁵³

El sistema de la AJCC recomienda su evaluación y se clasifica como presente o ausente.

Evaluación del margen de resección

La valoración del estado de los márgenes de resección del tumor es una medida importante del éxito de la cirugía.

Los márgenes analizados tras la resección colorrectal son el proximal, el distal, el mesentérico y el margen radial circunferencial (CRM).

Si la distancia desde los márgenes transversos, proximal y distal, hasta el tumor es ≥ 5 cm, la probabilidad de recurrencia en la anastomosis es mínima.¹⁵⁴

El CRM representa el margen del tejido blando adventicio del peritoneo o retroperitoneo en la sección del intestino resecado.¹⁵¹ El riesgo de recurrencia local está aumentado si el tumor está a una distancia ≤ 1 mm desde la superficie no peritoneal, sin embargo, el riesgo de recurrencia es muy bajo si el margen es ≥ 2 mm.¹⁵⁵

5.2 TIPO HISTOLOGICO

El tipo histológico no tiene significado pronóstico independiente del estadio. La clasificación histológica establecida por la OMS se presenta en la tabla IV.³³

Los tipos tumorales no formadores de glándulas, carcinoma en anillo de sello, carcinoma de células pequeñas y carcinoma indiferenciado presentan un peor pronóstico mientras que el carcinoma medular tiene un mejor pronóstico.

En este trabajo el tipo histológico se estudia por su posible valor pronóstico y solo se encuentran adenocarcinomas y adenocarcinomas mucinosos ya que son los más frecuentes.

5.3 GRADO DE DIFERENCIACIÓN TUMORAL

El grado tumoral tiene mayor significado pronóstico que el tipo histológico.

Existen numerosas clasificaciones, algunas se basan solo en características microscópicas como el grado glandular y otras incluyen más características.

Uno de los estudios más completos sobre la clasificación histológica es el de Grinnell, que estableció tres grados de diferenciación según la disposición glandular, la polaridad del núcleo y el número de mitosis:¹⁵⁶

- Grado I: Son tumores bien diferenciados, tienen una estructura glandular bien definida, con núcleos situados cerca de la capa basal y pocas mitosis nucleares.
- Grado II: Son moderadamente diferenciados y conservan la disposición glandular. En ellos se observan células con núcleos dispersos que difunden hacia los tejidos adyacentes y un mayor número de mitosis que en los tumores bien diferenciados.

- Grado III: Son tumores mal diferenciados, no tienen estructuras glandulares, ni conservan la polaridad del núcleo y en ellos se observa un elevado número de mitosis.

Esta es la clasificación que hemos usado en este trabajo para determinar el grado de diferenciación tumoral.

El CAP recomienda usar una subclasificación del grado en solo dos categorías, lo que da más consistencia diagnóstica, más simplicidad y reproducibilidad y mejor valor pronóstico.¹⁵⁷ Esta clasificación se basa únicamente en la proporción de formación glandular del tumor, mayor o menor del 50%:

- Grado bajo: bien diferenciado y moderadamente diferenciado.
- Grado alto: poco diferenciado y no diferenciado.

5.4 FACTORES SÉRICOS

En los CCR los niveles séricos prequirúrgicos del antígeno carcinoembrionario (CEA) se consideran factor pronóstico.

Muchos estudios indican que niveles mayores de 5-10 ng/ml se asocian con una peor evolución comparada con niveles menores aun teniendo un mismo estadio tumoral.¹⁵⁸

Sin embargo, la baja sensibilidad del antígeno en los estadios precoces del CCR limita el valor diagnóstico de este marcador,¹⁵⁹ por lo que la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) no recomienda su utilización como prueba de cribado en CCR. La ASCO recomienda la determinación de CEA preoperatorio en pacientes con CCR como un parámetro de posible utilidad en la estadificación del tumor.¹⁶⁰ Además, hay que tener en cuenta los diferentes factores que influyen en la relevancia de este antígeno como: procesos inflamatorios, hepatitis y tabaco.

La AJCC recomienda el análisis de este marcador sérico, y lo clasifica como elevado (C1) si el nivel de CEA en suero es ≥ 5 ng/ml, y no elevado (C0) si es < 5 ng/ml.

5.5 FACTORES MOLECULARES

La única característica molecular recomendada como factor pronóstico específico para CCR es el estado de estabilidad de los microsatélites, que informa sobre la funcionalidad de la reparación enzimática del ADN durante la replicación. Las alteraciones durante la replicación del ADN dan lugar a alteraciones en las secuencias cortas repetidas de ADN, generando acortamientos o alargamientos de las mismas, lo que se conoce como MSI.¹³⁸

En el síndrome de Lynch y en el 15-20% de los CCR esporádicos se observan mutaciones en los genes reparadores de tumores. Estos tumores tienen errores en la replicación del ADN y MSI-H, ya que el 30% o más de los marcadores estudiados

presentan MSI.¹⁶¹ La MSI-H se asocia a una mejor supervivencia, y a una menor tasa de recurrencias en etapas precoces.^{162,163} Algunos estudios sugieren que los MSI-H no se benefician del tratamiento adyuvante con fluoropirimidinas,^{164,165} aunque en un amplio estudio que incluyó 2141 pacientes en estadios II y III observaron que los pacientes con MSI y estadio III si se benefician de este tratamiento adyuvante.¹⁶⁶

Existen otros marcadores moleculares con gran potencial para su aplicación en la clínica del CCR. Su uso tiene ciertas limitaciones, debido a la gran variabilidad en los métodos de detección con diferentes sensibilidades, lo que nos ofrece, en ciertas ocasiones, resultados contradictorios.¹⁵⁸ Además, la mayoría de los estudios realizados para la validación de estos marcadores son retrospectivos y las poblaciones suelen ser muy diferentes lo que dificulta aún más la obtención de resultados concluyentes.

KRAS es el principal oncogén asociado a CCR. La mayoría de las mutaciones puntuales en *KRAS* provocan la activación constitutiva de la proteína, que se traduce en una proliferación celular descontrolada a través de la vía de transducción de señales RAS/RAF/MEK/ERK.¹⁶⁷ En CCR las mutaciones más frecuentes afectan a los codones 12 y 13 y aparecen en el 25% de los tumores de pacientes sin recidiva y en el 71% de las recidivas de CCR.¹⁵⁸ El papel de este gen como marcador pronóstico se ha evaluado en numerosos trabajos, pero los resultados son heterogéneos. El estudio retrospectivo RASCAL II asocia la sustitución aminoacídica de glicina por valina en el codón 12 de *KRAS* con un impacto significativo en la supervivencia de los estadios III.¹⁶⁸ Sin embargo, el estudio PETACC-3 no encontró que las mutaciones de *KRAS* tuvieran valor predictivo.¹⁶²

Otro componente de la vía RAS/RAF/MEK/ERK es el gen *BRAF* (homólogo B1 del oncogén virus del sarcoma murino v-raf), en el que la mutación V600E es la que se asocia principalmente a CCR.¹⁶⁹ En los tumores MSS la presencia de esta mutación se ha asociado con peor supervivencia a los 5 años, y este efecto es mayor en los estadios II. En pacientes de CCR en estadios II y III con resección total, la mutación V600E se mostró como factor pronóstico de SG principalmente en MSI de bajo grado (MSI-L) y MSS.¹⁶² Estudios más recientes asocian esta mutación con peor pronóstico en análisis multivariantes para pacientes de CCR en estadios II sin terapia adyuvante y estadios III tratados con 5-Fluorouracilo (5-FU).¹⁷⁰

La región cromosómica 18q es una zona frecuentemente alterada en CCR, en la que la pérdida alélica es el suceso mas común.¹⁵⁸ La delección del gen *DCC* (gen delecionado en CCR), localizado en esta región, es un evento muy frecuente en CCR, se ha detectado en el 73% de los carcinomas y en el 47% de los adenomas avanzados.¹⁷¹ La expresión génica de *DCC* es un fuerte predictor positivo en la supervivencia de estadios II y III del CCR, aumentando la supervivencia a los 5 años de un 61,6% a un 94,3% en estadios II y de un 33,2% a un 59,3% en estadios III cuando el gen está presente.¹⁷² Dos meta-análisis recientes observan una asociación independiente entre la pérdida de heterocigosidad en 18q y la SG en pacientes con CCR.^{162,173}

La alteración del gen *P53*, observada en el 50% de los cánceres, se considera como el evento genético más frecuente en el cáncer humano. La proteína p53 actúa en la proliferación y diferenciación celular, en la síntesis y reparación del ADN y en la muerte celular programada.¹⁵⁸ La frecuencia de alteraciones de *P53* en el cáncer de

colon es del 60 % .¹⁷⁴ Aunque el efecto en el pronóstico es discrepante, nuestro grupo ha observado, en la cohorte analizada en este trabajo, que las mutaciones en el codón 175, localizado en el exón 5, confieren mejor pronóstico en CCR mientras que las alteraciones en el exón 8 se relacionan con una peor evolución.¹⁷⁵ Diversos estudios sugieren que los pacientes de CCR en estadio III y sin expresión de *P53* se benefician del tratamiento adyuvante de 5-FU y levamisol, mientras que aquellos que presentan sobreexpresión de *P53* no se benefician.¹⁵⁸

La enzima Timidilato sintasa (TS) convierte la desoxiuridina monofosfato en desoxitimina monofosfato, un paso esencial en la síntesis del ADN. Esta enzima es diana celular para los fármacos citotóxicos de fluoropirimidina, usados ampliamente en el tratamiento del CCR. Estos fármacos deben ser transformados en nucleótidos para ser efectivos, su conversión a 5-fluoro-2'-desoxi-5' monofosfato permite la inhibición de TS y por lo tanto la síntesis de ADN.¹⁵⁸ En los últimos años la mayoría de los estudios han asociado tumores con expresión de altos niveles de TS con peor supervivencia y menor respuesta a 5-FU. Los últimos estudios realizados en pacientes con tumores colorectales en estadios B y C de Dukes muestran que la expresión elevada de TS predice peor SG en los pacientes tratados solo con cirugía pero no en los tratados con quimioterapia adyuvante.¹⁷⁶ Además, el análisis de la TS se puede combinar con el estado de los MMR para mejorar la predicción de la respuesta a 5-FU ya que se ha visto que en estadios III los tumores sin alteración en los MMR y con altos niveles de TS presentan mejor supervivencia cuando reciben quimioterapia en comparación con los pacientes sometidos solo a cirugía.¹⁷⁷

6. SECUENCIA ADENOMA CARCINOMA

El concepto de secuencia adenoma-carcinoma describe la progresión paso a paso del epitelio colorrectal normal a adenoma y a carcinoma. La transformación neoplásica de la mucosa colorrectal se caracteriza por una primera fase hiperproliferativa seguida de una alteración en la diferenciación celular, sobre la que se desarrolla un carcinoma invasor¹⁷⁸ (Figura 7).

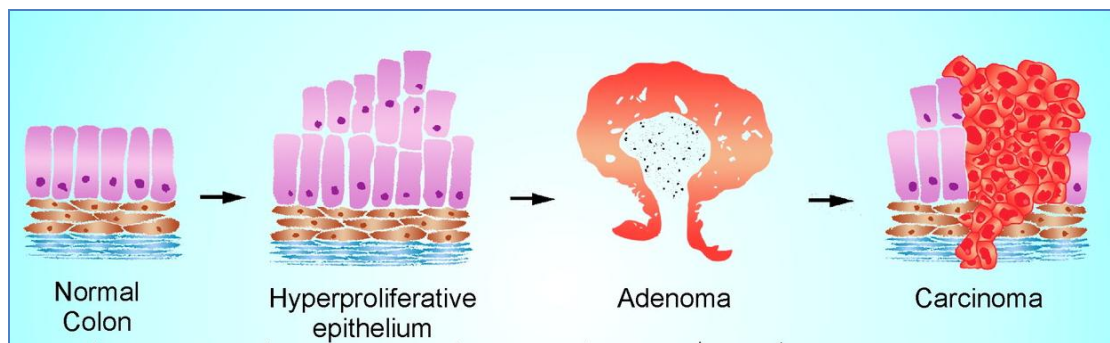


Figura 7. Secuencia adenoma-carcinoma. Imagen tomada de: www.pathologyoutlines.com.

Es una teoría plenamente aceptada por numerosos estudios patológicos, epidemiológicos y clínicos. El *National Polyp Study Workgroup* establece que el adenoma o pólipo adenomatoso precede en la mayoría de los casos (>95%) a la aparición del CCR.¹⁷⁹

La tasa de incidencia de adenomas se correlaciona con las tasas de incidencia de CCR en diferentes regiones geográficas, y las tasas de prevalencia de CCR aumentan tras migraciones desde zonas de bajo riesgo a zonas de alto riesgo.¹⁸⁰

Además, la distribución de los adenomas en el intestino grueso es más o menos similar a la del CCR. Diversos estudios clínicos observan que tanto los adenomas como los tumores muestran una distribución anatómica prevalente en el lado izquierdo.¹⁹

Una incidencia alta de pólipos adenomatosos precede en algunos años al CCR, así, los individuos afectados por síndromes que presentan una fuerte predisposición al desarrollo de adenomas, como FAP, desarrollan CCR a los 30-50 años.¹⁸¹

También se ha observado que el foco del carcinoma suele detectarse en los pólipos adenomatosos. Cuando se identifica un carcinoma infiltrante en un estadio precoz, suele encontrarse tejido adenomatoso adyacente¹⁸².

Los programas de seguimiento para detectar adenomas y extirpar todos los que se identifican reducen la incidencia de CCR. Hay estudios longitudinales que muestran un riesgo alto de desarrollar CCR en pacientes a los que no se les ha resecionado los adenomas, y la polipectomía disminuye el riesgo de CCR.^{179,183}

7. BASES GENÉTICAS DE LA CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL

La biología molecular del CCR es un área de intensas investigaciones. Las características genéticas permiten diferenciar y separar entidades biológicas definidas, con una patología molecular y un resultado clínico definido. Al mismo tiempo permiten establecer una correlación entre el patrón citogenético y la evolución del paciente.

7.1 VÍAS DE DESARROLLO DEL CARCINOMA COLORRECTAL

La transición desde el epitelio normal a adenoma y a carcinoma se asocia con eventos moleculares adquiridos.^{184,185}

Este modelo se basa en el concepto de que cada uno de estos eventos mutacionales le confiere a cada una de las células del tumor una ventaja de crecimiento.¹⁸⁶ Estas ventajas adicionales de crecimiento en comparación con el resto de la células del tumor traen como resultado la expansión clonal y al final la progresión del tumor.¹⁸⁷

A nivel molecular la alteración que aparece en primer lugar se observa en el gen *APC*, en el cromosoma 5q, que inactiva este gen y permite la proliferación celular y el desarrollo del adenoma temprano. Otras mutaciones genéticas incluyen la activación de oncogenes, como resultado de una mutación en el gen *KRAS*, y la pérdida de genes

supresores de tumores, causada por la delección del gen *DCC* en el cromosoma 18q y la mutación del gen *P53* en el cromosoma 17p (Figura 8).

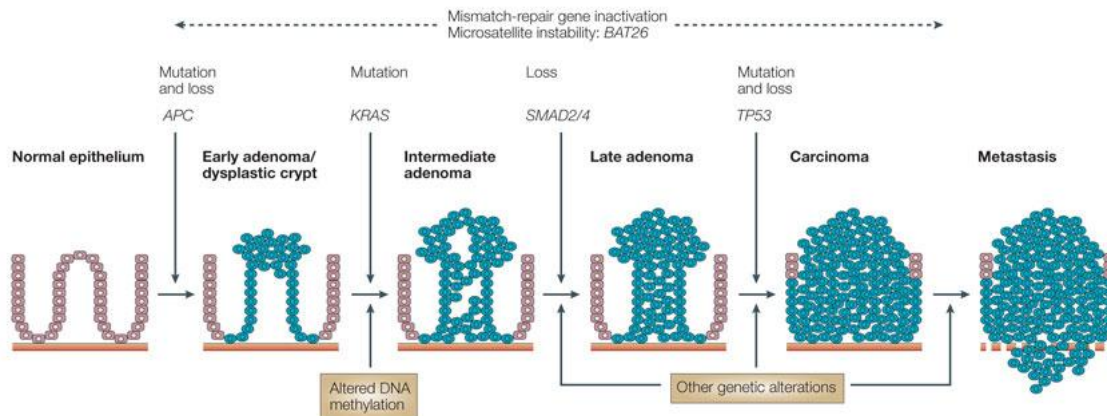


Figura 8: Alteraciones genéticas en la evolución desde el adenoma hacia el carcinoma. Imagen tomada de: www.nature.com

Durante más de dos décadas, el modelo de la progresión de los sucesos en el CCR ha evolucionado desde la vía mutacional lineal, propuesta por Volgestein en 1988, hasta conceptos más complejos en las que un conjunto de rutas mutacionales dan lugar a tumores heterogéneos.¹⁸⁸

El modelo de progresión paso a paso que engloba las dos rutas genéticas que explican la etiología del cáncer desde la neoplasia benigna hasta el adenocarcinoma describe por un lado las alteraciones genéticas relacionadas con los oncogenes y los genes supresores que controlan directamente el ciclo celular y la apoptosis, como *APC*, *KRAS* y *P53*, y por otro lado las mutaciones en los MMR.¹⁸⁹

Sin embargo, el comienzo de un proceso cancerígeno puede ocurrir también a través de mecanismos epigenéticos.¹⁹⁰ La aparición temprana de las alteraciones epigenéticas lleva a la hipótesis de que este mecanismo permite la consiguiente acumulación de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas, promueve el desarrollo y la progresión tumoral y da lugar a una vía alternativa de promoción del cáncer.¹⁹¹

Las tres vías patogénicamente distintas para el desarrollo del CCR son la vía de la inestabilidad cromosómica (CIN), la vía de la MSI y la vía de la metilación. En las tres se produce una acumulación progresiva de múltiples mutaciones que pueden llevar al epitelio al desarrollo del carcinoma colorrectal, sin embargo, los genes que intervienen y los mecanismos que justifican la acumulación de las mutaciones son diferentes.

Inestabilidad Cromosómica

La CIN está presente en el 85% de los CCR y se caracteriza por alteraciones generalizadas en el número cromosómico, pérdidas detectables a nivel molecular de partes de los cromosomas 5q, 18q y 7p y mutaciones en el oncogén *KRAS*.

Los genes involucrados en la condensación cromosómica, en la unión de cromátidas hermanas, en la estructura y función cinetocórica y en la formación de los microtúbulos, así como en los puntos de control que controlan el ciclo celular son los relacionados con la CIN.¹⁹² Los principales genes implicados en esta vía son *APC* (5q), *DCC* (18q) y *P53*(17p).^{15,185,193} Las pérdidas cromosómicas se asocian además con la

inestabilidad a nivel molecular y cromosómico y dan lugar a una acumulación progresiva de mutaciones en una serie de oncogenes y genes supresores de tumores.

Los tumores que se desarrollan a través de esta vía suelen localizarse en los tramos distales del colon. Los pacientes con estos tumores tienen peor pronóstico, aunque se benefician de los tratamientos adyuvantes de quimioterapia.

Inestabilidad de Microsatélites

La vía de la MSI define tumores con una dotación cromosómica intacta y que debido a defectos en los sistemas de reparación del ADN adquieren mutaciones en genes importantes asociados con el cáncer. Estos cánceres se detectan a nivel molecular por las alteraciones en unidades repetitivas del ADN que aparecen a lo largo del genoma, conocidas como microsatélites. El 15% de los CCR esporádicos se desarrollan por esta vía tumorigénica.

La reparación defectuosa del ADN causada por la desactivación de los MMR es el acontecimiento fundamental y, probablemente, inicial en los tumores colorrectales que se originan por esta vía.¹⁹⁴

Los tumores de la vía MSI presentan localización colónica proximal. Los pacientes con estos tumores tienen mejor pronóstico, principalmente los MSI-H y no se benefician de los tratamientos adyuvantes de quimioterapia.

Vía de la metilación

La vía de la metilación se caracteriza por una metilación generalizada en regiones promotoras de diversos genes. El 10% de los CCR esporádicos presentan estas características.

La metilación errónea de las islas CpG (citosa-fosfato-guanina) es la principal alteración epigenética detectada y a este fenómeno se le conoce como fenotipo metilador de islas CpG (CIMP).¹⁹¹ A esta vía que cursa con CIMP se la conoce también como vía serrada por su alta prevalencia en los tumores de morfología serrada.¹⁹⁵

En muchos casos también se observa MSI-H debido a la metilación del gen reparador *hMLH1*.¹⁹⁶

7.2 PATRONES DE ALTERACIÓN GÉNICA

En el desarrollo del tumor existen muchos tipos de alteraciones que dan lugar a la inestabilidad genómica, las diferentes mutaciones que se observan pueden alterar la secuencia nucleotídica del ADN, principal proceso de mutación génica, o no alterar esta secuencia y modificar las características del ADN.

7.2.1 Alteraciones genéticas

Las alteraciones genéticas que se observan en un tumor pueden tener diferente etiología y afectar a diferentes clases de genes implicados en el desarrollo de tumores.

Dichas alteraciones pueden ser clasificadas en cuatro tipos principales:

- Cambios en la secuencia del ADN: son mutaciones que afectan a uno o a unos pocos nucleótidos que son sustituidos, añadidos o eliminados de la secuencia de ADN.
- Alteraciones cromosómicas numéricas: se deben principalmente a la ganancia o pérdida completa o parcial de cromosomas.
- Alteraciones cromosómicas estructurales: son intercambios de material genético entre diferentes cromosomas.
- Amplificaciones génicas: son alteraciones poco comunes, en las que una parte del genoma esta copiada.

7.2.2 Alteraciones epigenéticas

Las alteraciones epigenéticas son modificaciones en el ADN que no cambian la secuencia de bases de ADN y no causan cambios genéticos pero suponen cambios con consecuencias funcionales semejantes a las mutaciones.¹⁹⁷ La metilación de los genes es un tipo de modificación epigenética cuya función es regular la transcripción, y por lo tanto la expresión génica.¹⁹⁸

La metilación se produce en los dinucleótidos CpG presentes en un 5-10% del genoma humano.¹⁹⁹ El nivel de metilación en el genoma humano es muy elevado, ya

que, aproximadamente del 70 al 80% de los dinucleótidos CpG, están metilados en la posición 5' de la C.²⁰⁰

El mecanismo de la metilación está catalizado por las enzimas ADN-metiltransferasas (DNMT), encargadas de introducir un grupo metilo (-CH₃) en posición 5' de las citosinas transformándolos en 5'-metilcitosinas.²⁰¹

La mayoría de los dinucleótidos CpG no metilados se encuentran en pequeños grupos conocidos como islas CpG, y se localizan cerca o incluidos en los promotores y en los primeros exones de los genes. Las islas CpG comprenden el 1-2% del genoma y son secuencias de aproximadamente 0,5-4 kilobases (kb) de longitud, con un contenido en CG del 55%. Aparecen cada 100 kb y se estima que el 50-60% de los genes contiene un promotor asociado a islas CpG.^{202,203}

El mantenimiento de dichas islas es importante en el proceso de transcripción de genes. Las islas CpG situadas en las regiones reguladoras están sin metilar excepto en los genes de impronta, genes del cromosoma X inactivo en mujeres y los genes no transcritos de cromosomas autosómicos. Los genes humanos que contienen las islas CpG totalmente sin metilar son genes transcripcionalmente activos, como los genes *housekeeping*.²⁰⁰

Durante los últimos 15-20 años se han observado patrones anormales en la metilación del ADN como un cambio molecular más en las neoplasias humanas. Células transformadas de todos los tipos presentan, simultáneamente, pérdidas de metilación en

zonas normalmente metiladas, un aumento de la DNMT y un aumento de las zonas de ADN hipermetiladas.²⁰¹ Cada uno de estos cambios conlleva consecuencias importantes en la estructura y función del ADN.

La metilación del ADN afecta a la expresión génica. La hipometilación facilita una expresión génica anormalmente elevada, ya que causa la inducción de genes que no estaban siendo expresados. Esto puede contribuir a alteraciones que pueden jugar un papel en la carcinogénesis, por ejemplo, incrementando la expresión de oncogenes. Por el contrario la hipermetilación del ADN puede ser oncogénica cuando el gen inactivado es un gen supresor.^{197,204}

Fenotipo metilador.

En ciertos tumores de CCR se ha observado que varios genes supresores de tumores aparecen silenciados mediante metilación de sus promotores. Ciertos CCR presentan metilación simultánea en los promotores de varios genes. A este fenómeno se le conoce como CIMP.²⁰⁵

Los tumores CIMP positivos presentan un perfil clínico, patológico y molecular característico, están asociados con localización tumoral proximal, género femenino, histología mucinosa, poca diferenciación, presencia de MSI, alta tasa de mutaciones en el gen *BRAF* y baja tasa de mutaciones en los genes *P53* y *KRAS*.^{206,207}

Se ha estudiado una gran cantidad de genes para definir mejor el CIMP. El estudio realizado por Weisenberger y cols., en el que analizan 195 islas CpG, selecciona

los genes *CDKN2A* (inhibidor 2A de quinasas dependientes de ciclina), *CRABP1* y *hMLH1* como principales marcadores de CIMP en CCR.²⁰⁷

Ogino y cols, estudiando 920 tumores colorrectales, propone *RUNX3*, *IGF2*, *CACNA1G* y *hMLH1* como genes mínimos para definir el fenotipo metilador y confirma la fiabilidad en la predicción de los genes marcadores de CIMP propuestos por Weisenberger. Además clasifica el CIMP como alto grado (CIMP-H) si el número de genes metilados es mayor de 4 o bajo grado (CIMP-L) si es menor.²⁰⁸

7.3 GENES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENÉISIS

Los genes que pueden ser dianas para uno o varios tipos de alteraciones están implicados en el control de la proliferación celular, diferenciación y muerte celular programada o apoptosis, por lo que están implicados en la carcinogénesis. Los genes que aparecen más frecuentemente alterados en la carcinogénesis colorrectal se describen en la tabla XIV.²⁰⁹

Tabla XIV: Principales genes implicados en la carcinogénesis colorectal.

| Gen | Cromo-soma | Frecuencia de la alteración | Tipo de gen | Función normal | Alteración |
|------------------------|-------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------|
| <i>KRAS</i> | 12p12 | 30-40% | Oncogén | Transducción de señales | Mutaciones puntuales |
| <i>HER2/Neu</i> | 17q12 | 4% | Oncogén | Receptor factor de crecimiento | Amplificación |
| <i>MYC</i> | 8q24 | 60% | Oncogén | Regulación ciclo celular | Sobreexpresión |
| <i>BRAF</i> | 7q34 | 8-12% | Oncogén | Regulación proliferación | Mutaciones puntuales |
| <i>PTEN</i> | 10q23.3 | 10-15% | Supresor | Regulación ciclo celular | Pérdida heterocigosidad |
| <i>APC</i> | 5q21 | 85% | Supresor | Adhesión celular | Pérdida heterocigosidad |
| <i>DCC</i> | 18q21 | 70% | Supresor | Adhesión celular | Pérdida heterocigosidad |
| <i>TP53</i> | 17p13.1 | 35-55% | Supresor | Parada ciclo celular | Mutación germinal |
| <i>P16</i> | 9p21 | 18-61% | Supresor | Parada ciclo celular | Hipermetilación |
| <i>hMLH1</i> | 13p21 | 30% | Reparador | Reparación del ADN | Mutación germinal |
| <i>hMSH2</i> | 2p22 | 60% | Reparador | Reparación del ADN | Mutación germinal |

Podemos agrupar estos genes en 3 grupos diferentes dependiendo de la función que tengan en la célula sana.

7.3.1 Protooncogenes

Los protooncogenes son genes con un papel fundamental en la división y proliferación celular. Cuando estos genes se alteran se les denomina oncogenes ya que pueden hacer que la célula se transforme en una célula cancerosa, induciendo una proliferación celular descontrolada que puede derivar en un proceso tumoral.

El protooncogén codifica una proteína, generalmente relacionada con la proliferación celular o la apoptosis, que actúa sólo cuando recibe señales reguladoras específicas. Muchos de ellos están intensamente expresados durante ciertas etapas del ciclo celular y especialmente relacionados con fases definidas de la embriogénesis, fundamentalmente son factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, receptores hormonales, o factores de transmisión intracelulares.²⁰⁹

En el caso de los protooncogenes, la alteración de un solo alelo es suficiente para producir la transformación del protooncogén a oncogén. Se expresan de forma dominante.

Los principales oncogenes asociados a CCR y su localización, función y frecuencia de aparición en estos tumores se muestran en la tabla XIV.

7.3.2 Genes supresores

Los genes supresores codifican factores necesarios para el funcionamiento celular normal, y su pérdida da lugar al desarrollo de tumores. Pertenecen a un grupo de

genes cuyos productos están involucrados en la regulación negativa del ciclo celular. La pérdida en la célula de uno de estos genes supone la proliferación de modo incontrolada de la misma.

Al igual que los protooncogenes, los genes supresores codifican diferentes proteínas que actúan en distintos puntos de las rutas de señalización, del control del ciclo celular y de la apoptosis. Las diferentes proteínas pueden ser factores inhibidores del crecimiento celular, sus receptores, proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales, factores de transcripción y proteínas que frenan el ciclo celular o producen apoptosis.²⁰⁹

La pérdida de la función de un gen supresor sólo se produce cuando han mutado los dos alelos. Es decir, la forma mutada de un gen supresor se expresa con carácter recesivo, por lo tanto, la alteración de un solo alelo no produce pérdida de función, porque las moléculas de proteína sintetizadas a partir del alelo normal pueden suplir esa carencia, al menos parcialmente.

Los principales genes supresores asociados a CCR y su frecuencia de aparición en estos tumores se muestran en la tabla XIV.

7.3.3 Genes reparadores

Los genes reparadores son los encargados de conservar la secuencia del ADN en las células, sus funciones son reconocer los nucleótidos erróneos, eliminarlos y

reemplazarlos por los nucleótidos correctos. Actúan principalmente durante el proceso de replicación del ADN ya que se pueden producir errores en la incorporación de bases.²¹⁰ Cuando los genes reparadores se alteran, los errores producidos durante la replicación celular no se corrigen. Los genes reparadores identificados hasta el momento son: *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hMLH1*, *hMLH3*, *hPMS1* y *hPMS2*.²¹¹

El defecto en los genes reparadores puede deberse a diferentes alteraciones genéticas: mutaciones puntuales, metilación de la región promotora, inserciones o deleciones. En el CCR esporádico la alteración de *hMLH1* más frecuente es la metilación de su región promotora^{212,213} mientras que en HNPCC se han descrito en la mayoría de los casos mutaciones germinales.²¹⁴

La alteración de los genes reparadores hace que no se puedan corregir estos errores dentro de las secuencias de microsatélites. En 1998 el NCI estableció 5 secuencias de microsatélites para determinar la MSI en CCR: dos mononucleótidos BAT25 y BAT26 y tres dinucleótidos D2S123, D5S346 y D17S250. La alteración en dos o más marcadores fue definida como MSI-H, en un solo marcador como MSI-L, y la ausencia de alteración en los marcadores se definió como MSS.²¹⁵

La MSI-H ocurre en aproximadamente un 90 % de los casos de HNPCC y en un 15 % de los tumores colorrectales esporádicos.²¹⁶

Al igual que los genes supresores, es necesario que se inactiven ambos alelos para que se produzca la pérdida de función del gen. En los casos hereditarios la

inactivación de los alelos se produce por la mutación germinal de un primer alelo y la mutación somática del segundo, mientras que en los casos esporádicos ambas son mutaciones somáticas.²¹⁷

7.4 CICLO CELULAR

Las células se renuevan continuamente en un proceso de recambio celular que requiere una estricta regulación genética. El perfecto control del ciclo celular así como de los genes implicados en su correcto funcionamiento es esencial para mantener los niveles normales de proliferación celular, impidiendo de este modo el crecimiento celular incontrolado.²⁰²

El ciclo celular es un proceso cuya finalidad es producir dos células hijas de idénticas características. La replicación del genoma y la división de una célula en dos células duran entre 18 y 25 horas y se divide en 4 fases diferentes: La fase G₁ en la que la célula se prepara para la división, la fase S en la que se genera una copia completa del material genético, la fase G₂ en la que se comprueba que la duplicación del ADN ha sido correcta y se reparan los posibles errores y la fase M en la que el ADN duplicado se condensa formando los cromosomas que se segregan en la dos células hijas²⁰² (Figura 9).

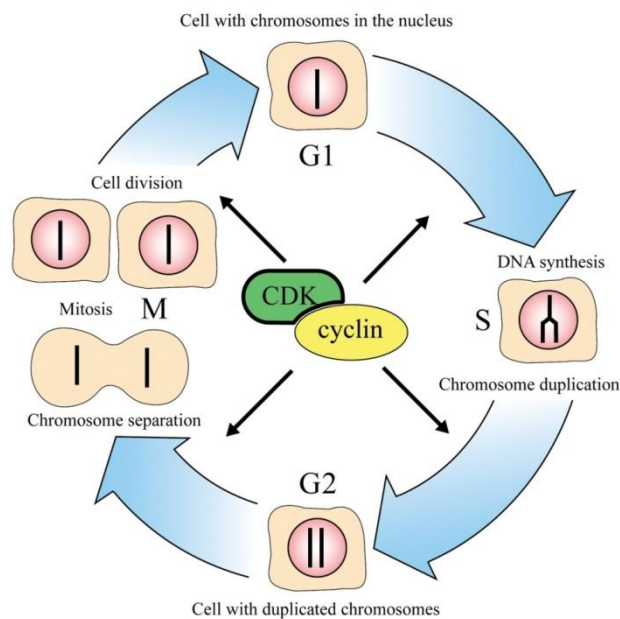


Figura 9: Esquema del ciclo celular y sus diferentes fases. Imagen tomada de: www.corbioqui.blogspot.com.es

La maquinaria básica del ciclo celular está constituida por enzimas denominadas quinasas o proteín-quinasas (PK), capaces de fosforilar otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfato. Las quinasas que coordinan los procesos de control del ciclo celular se denominan quinasas dependientes de ciclinas o CDKs porque su actividad de fosforilar proteínas está regulada por la asociación reversible de otras proteínas llamadas ciclinas.¹⁹⁷

El punto de restricción R, en la fase G₁, es el principal punto de control del ciclo celular y está regulado por las ciclinas tipo D y E. Las ciclinas de tipo D se unen a varias quinasas dependientes de ciclina: CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6 formando complejos binarios.¹⁹⁷

Una de las funciones básicas del complejo ciclina D-CDK4 es fosforilar la proteína del retinoblastoma (RB), producto del gen supresor de tumores *RB*, y activar así la expresión de los genes necesarios para la entrada en la fase S.¹⁹⁷

La proteína RB no está fosforilada durante la fase G₁ y se une a varias proteínas inhibiéndolas. Entre estas proteínas se encuentran algunos factores activadores de la transcripción como E2F, que controlan la expresión de genes críticos para la síntesis de ADN. De esta forma, RB bloquea la progresión de las células, manteniéndolas en fase G₁. Sin embargo, tras su fosforilación en el punto R, la proteína RB es inactivada y ya no es capaz de unir y bloquear a estos factores activadores, promoviendo la entrada de la célula en fase S.^{197,202} Al final de la fase M de mitosis, RB vuelve a su estado hipofosforilado por acción de las fosfatasas.

Un mecanismo de regulación de los complejos ciclina-CDK que juega un papel crucial en la progresión del ciclo celular es la unión de proteínas que inhiben directamente la actividad quinasa. Estas proteínas se denominan inhibidores de complejos ciclinas CDK o CDKIs. Uno de estos CDKIs está compuesto por las proteínas P16^{INK4a}, P15^{INK4b}, P18^{INK4c} y P19^{INK4d}, que forman complejos con las CDK4 y CDK6 inhibiendo su unión a las ciclinas D. Los CDKIs inhiben la fosforilación del RB y el resultado final es que las células se frenan en el punto de restricción R. Estas proteínas funcionan como supresoras de tumores por su efecto bloqueante en el ciclo celular.^{218,219}

También hay oncogenes que ejercen su función activando el inicio de la fase G₁, entre ellos están *RAS*, *RAF*, *MYC*, *FOS* y *JUN*. La cascada RAS/RAF/MEK/ERK es responsable de la activación de las CDK4 y CDK6, en el inicio de la fase G₁ del ciclo celular a través de la regulación transcripcional de ciclina D1.²²⁰

8. GEN *BRAF*

8.1 DESCRIPCION DEL GEN *BRAF*

El gen *BRAF* es un protooncogén localizado en el cromosoma 7q34 y formado por 18 exones. Codifica para una serina/treonina quinasa de 84 KDa (KiloDaltons) y 766 aminoácidos.

La proteína BRAF inducida por factores de crecimiento y mediada por la proteína RAS, activa la vía de transducción de señales RAS/RAF/MEK/ERK (Figura 10). Esta vía, en condiciones fisiológicas, se activa por medio de factores mitógenos, factores de crecimiento y citoquinas y su función es regular el crecimiento celular, la supervivencia y la capacidad para invadir tejidos.^{221,222}

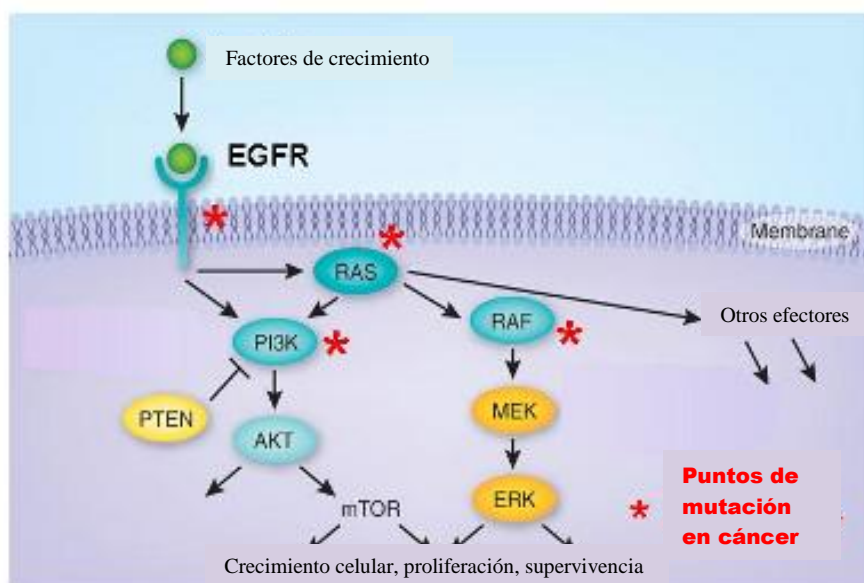


Figura 10: Esquema de la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK. Imagen tomada de: www.biopharmconsortium.com

El efecto regulador de la transcripción de factores de proliferación y de la supervivencia celular explica el potencial oncogénico de *BRAF* activado.

8.2 ALTERACIONES EN EL GEN *BRAF*

El gen *BRAF* es susceptible de diversas mutaciones que generan una proteína alterada. Estas mutaciones pueden causar enfermedades a través de dos vías diferentes. En primer lugar, las mutaciones pueden ser heredadas y causar defectos desde el nacimiento. Esto ocurre en el síndrome cardiofaciocutáneo, enfermedad caracterizada por defectos cardíacos, retraso mental y dismorfia facial característica. Diversos estudios han demostrado la existencia de mutaciones heterocigotas de los genes *RAS*, *RAF* y *MEK* en sujetos que presentan el síndrome.^{223,224} En segundo lugar pueden aparecer en adultos y se relacionan con diversos tipos de cánceres, incluido el CCR. La frecuencia de estas mutaciones varía mucho según el tipo de cáncer. Se han encontrado mutaciones somáticas en el gen *BRAF* en el 66% de los melanomas malignos,¹⁶⁹ en el 5% de los CCR y en el 1-3% de los cánceres de pulmón.²²⁵

Se han identificado más de 30 mutaciones en el gen *BRAF* relacionadas con procesos neoplásicos. La mayoría de las mutaciones aparecen en el dominio quinasa de la proteína, principalmente en el segmento de activación que protege el sitio de unión al sustrato, y menos frecuentemente en el bucle G, que media la unión a Adenosin Trifosfato.²²⁶

El grupo de Davies detectó cuatro tipos de mutaciones puntuales en *BRAF* analizando 15 líneas celulares cancerosas. Dos se localizan en el exón 15 que afectan al segmento de activación de la proteína: T1796A que da lugar a la mutación V600E y C1786G que genera la sustitución L596V. Las otras dos se localizan en el exón 11, situado en el bucle G: G1388T que origina G463V y G1403C que da lugar a G468A. Las cuatro proteínas mutadas presentan una actividad quinasa basal elevada en comparación con las no mutadas, principalmente las variantes V600E y G468A cuya actividad quinasa es unas 10 veces superior a la proteína original. La función de las cuatro variantes es la misma, estimulan la actividad de la proteína Erk endógena, si bien los mutantes V600E y G468A potencian la fosforilación de Erk en mayor medida que las otras dos.¹⁶⁹

Las mutaciones en el gen *BRAF* se asocian a aquellos tipos de tumores en los que también son frecuentes las mutaciones en el gen *RAS*. Esto sugiere que la activación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK, que puede conseguirse a través de mutaciones en diferentes niveles de la vía, es un evento importante en el proceso de tumorigénesis y por este motivo esta ruta se activa en una amplia proporción de tipos de cánceres.¹⁶⁹

Esta ruta de señalización celular aparece frecuentemente hiperactivada en CCR. Las mutaciones en el gen *KRAS* son las más frecuentes, apareciendo en un 30-40% de todos los CCR. Las mutaciones en *BRAF* aparecen con una frecuencia de 5-20%. Las mutaciones en estos dos genes son mutuamente excluyentes, lo que significa que tienen la misma función en la tumorigénesis.²²⁷

Davies y cols. encontraron algunos tumores o líneas celulares con mutaciones simultaneas en *RAS* y *BRAF* pero ninguna de las mutaciones de *BRAF* fue la V600E, lo que sugiere que esta mutación es biológicamente diferente de las demás. Esta mutación no requiere la función celular de RAS para la proliferación celular, mientras que otros mutantes de *BRAF* necesitan la interacción con RAS para ser fosforilados y activados.¹⁶⁹

Mutación V600E

La alteración más frecuente de la proteína *BRAF*, que aparece en el 90% de los casos, ocurre en el exón 15 en la posición nucleotídica 1796. Es una transversión de timina a adenina que en el codón 600 da lugar a una sustitución de una valina por una glutamina, conocida como V600E.¹⁶⁹ Esta mutación aparece en un 10-20% de los CCR y ocurre preferentemente en tumores de localización proximal y con MSI.²²⁸

La mutación V600E induce la activación constitutiva de *BRAF* y genera una señalización constitutiva de la vía RAS/RAF/MEK/ERK, y por lo tanto activa la transcripción de genes relacionados con la inducción de la telomerasa, la secreción de factores de crecimiento, la capacidad para invadir y metastatizar, la evasión de la apoptosis y la resistencia a la quimioterapia. Además, esta mutación se asocia a la inactivación transcripcional del gen reparador *hMLH1* por hipermetilación de su promotor, pero no a la mutación en la línea germinal de este.²²⁷

El hallazgo de la mutación *BRAF/V600E* no se asocia a la presencia de mutaciones en línea germinal de los genes MMR, ni al HPNCC de etiología

desconocida. Así la mutación V600E se perfila como un marcador de carácter esporádico del CCR con MSI-H, con independencia de los criterios clínicos.²²⁹ Esta asociación con MSI-H viene dada por la relación con la metilación del gen *hMLH1* y con CIMP como ya se ha comentado.²²⁶

Los tumores que presentan la mutación en *BRAF* presentan un peor pronóstico, con una disminución de la supervivencia a los 5 años, especialmente si presentan fenotipo MSS.^{228,230} Debido a la asociación entre la mutación V600E y la MSI, el impacto en el pronóstico de ambos marcadores debe analizarse evaluando las dos alteraciones simultáneamente. Así, en los estadios III de CCR se ha observado que los pacientes con *BRAF* mutado y MSS presentan un pronóstico desfavorable mientras que los que no presentan mutación en *BRAF* y son MSI-H tienen un pronóstico favorable. Las combinaciones de *BRAF* no mutado con MSS o *BRAF* mutado con MSI-H se encuentran en posiciones intermedias.²²⁸

La principal característica de esta mutación es que hace a los CCR metastásicos resistentes a terapias basadas en anticuerpos monoclonales anti-EGFR (receptor de crecimiento vascular epidérmico).^{231,232} Los pacientes con esta mutación en sus tumores no se benefician de estas terapias, lo que hace que el análisis molecular para la determinación de la mutación ayude a optimizar la selección de los pacientes candidatos a recibir estos tratamientos.

9. GEN *P16*

9.1 DESCRIPCION DEL GEN *P16*

El gen *P16* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 9, concretamente en 9p21, es un gen regulador del ciclo celular en la fase G_1 . Se denomina también *MTS-1* (major tumor suppressor), *INK4a* (inhibidor de quinasas 4a dependientes de ciclinas) y *CDKN2A*.²³³

Este gen está formado por tres exones: el exón 1 de 125 pares de bases (pb), el exón 2 de 307 pb y el exón 3 de 12 pb²³³ y transcribe dos mRNAs (Acido Ribonucleico mensajero) que difieren en el primer exón y comparten el segundo y el tercero, aunque con fases de lectura alternativas (ARF). Cada transcrito tiene un exón 5' específico, exón 1 α o exón 1 β , y regulados por dos promotores diferentes y codifican dos proteínas diferentes denominadas P16^{INK4a} y P14^{ARF} que no comparten secuencia aminoacídica.²³⁴ El mRNA transcrito que contiene el exón 1 α , el exón 2 y el exón 3 codifica la proteína P16^{INK4a}, de 15,8 KDa y formada por 156 aminoácidos²¹⁹. El mRNA transcrito que contiene el exón 1 β , el exón 2 y el exón 3 codifica la proteína P14^{ARF} y tiene un peso molecular de 13,8 KDa²³⁵ (Figura 11).

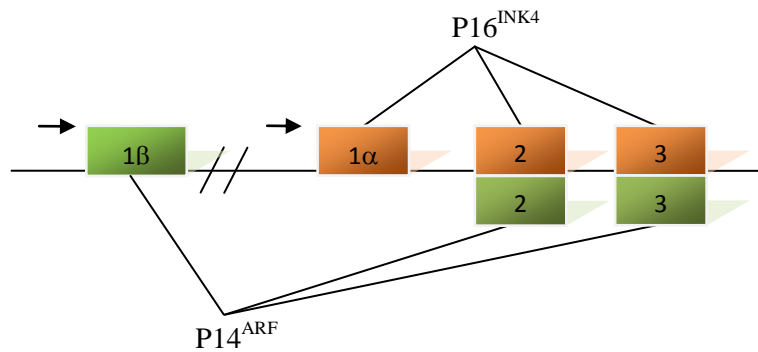


Figura 11: Estructura del locus *CDKN2A*.

La proteína $P16^{INK4a}$ tiene la capacidad de parar el ciclo celular en la fase G_1 mediante la inhibición de los complejos ciclinas-CDKs mientras que la proteína $P14^{ARF}$ es capaz de detener el ciclo celular tanto en la fase G_1 como en la fase G_2 pero mediante mecanismos diferentes.²³⁶

La proteína $P16$ ejerce su acción a través de la inhibición de la fosforilación de RB^{219} (Figura 12).

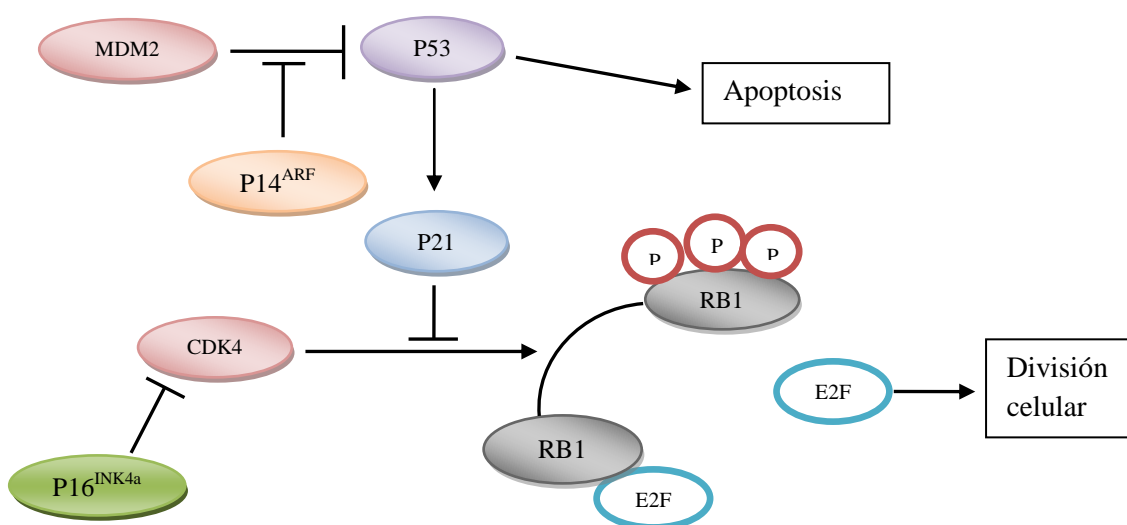


Figura 12: Esquema de la actividad de *P16*.

9.2 ALTERACIONES EN EL GEN *P16*

El gen *P16* aparece alterado en varios tipos de tumores primarios como melanomas, carcinoma de pulmón, de vejiga, de mama, de esófago, cabeza y cuello.²³⁴

Los principales mecanismos de inactivación de *P16* son las deleciones homocigotas descritas en líneas celulares de CCR²³⁷ y la hipermetilación del promotor descrita en el 40% de los CCR.

La hipermetilación de las islas CpG del gen *P16* se extiende desde la región promotora hasta el exón 1, lo que provoca el silenciamiento transcripcional del gen.²³⁸ Esta alteración de aparición temprana en la secuencia tumoral es un mecanismo que se ha asociado a la pérdida de proteína en las células neoplásicas lo que conlleva a la progresión continua del ciclo celular.²³⁹

El significado clínico-patológico de la hipermetilación del gen *P16* está en controversia. Hay numerosos estudios que avalan un peor pronóstico en el CCR asociado a esta alteración,^{240,241} observando algunos, asociación entre un alto porcentaje de hipermetilación en *P16* y metástasis locoregionales o a distancia.²⁴²

El tratamiento con inhibidores de la metilación del ADN puede restablecer la actividad de *P16* y disminuir la tasa de crecimiento de las células tumorales. La administración de fármacos como los análogos de citosina podría ser capaz de recuperar la función de estos genes supresores de tumores y disminuir la progresión del CCR.

10. VARIABLE MET2

En el CCR esporádico la alteración de *hMLH1* más frecuente es la metilación de su región promotora. El gen reparador *hMLH1* está localizado en 3p21.3 y codifica para una proteína que forma parte del complejo multiproteico que interviene en la reparación del ADN durante la replicación.^{212, 213}

El estudio epigenético de este gen se realizó anteriormente en este grupo de investigación, en los tumores MSI del mismo grupo de pacientes, observándose una elevada frecuencia de metilación.

La alta frecuencia del CIMP en CCR, el perfil clínico, patológico y molecular característico de este fenotipo^{197,198} y el aumento de los estudios de CIMP nos lleva a ampliar nuestro estudio de metilación incluyendo en este trabajo los datos de la metilación del gen *hMLH1* analizados previamente.

Los genes *P16* y *hMLH1* se han definido como importantes en el análisis del CIMP.^{207,208} Ante estos datos, y para aproximarnos al fenotipo metilador, se ha creado en este trabajo una variable denominada MET2 que incluye la metilación simultánea de los genes *P16* y *hMLH1*. Ya que el análisis de la metilación de *hMLH1* solo se realizó en los tumores MSI, esta variable se limita a este grupo de tumores.

Por lo tanto, consideramos metilación MET2 en aquellos tumores MSI en los que se detecta metilación simultánea de los promotores de los genes *P16* y *hMLH1*.

OBJETIVOS

1. Analizar la frecuencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en pacientes diagnosticados de CCR.
2. Analizar la frecuencia de la metilación de la región promotora del gen *P16* en los pacientes con CCR.
3. Analizar la variable MET2, generada por la combinación de la metilación de la región promotora del gen *P16* y del gen *hMLH1*, en los pacientes con CCR y MSI.
4. Estudiar la relación entre las alteraciones genéticas estudiadas y los factores pronóstico clásicos en el CCR.
5. Estudiar la relación entre otras alteraciones genéticas analizadas previamente, MSI y metilación en el promotor del gen *hMLH1*, las alteraciones genéticas estudiadas, *P16*, *BRAF* y MET2, y los factores pronóstico clásicos en el CCR.
6. Determinar el valor pronóstico de estas alteraciones genéticas en relación con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad.
7. Analizar si la mutación V600E, la metilación del promotor de *P16* y la variable MET2 presentan valor pronóstico independiente.

HIPÓTESIS

El carcinoma colorrectal constituye un problema epidemiológico de gran magnitud, dada su alta incidencia. Forma parte de un grupo de neoplasias en las que puede ser complicado prever su evolución biológica. Este proyecto parte de la hipótesis de que el estudio de la biología molecular y la genética permitirán efectuar una mejor caracterización y mejorar la clasificación de este tumor, seleccionando un subgrupo de pacientes con mejor evolución.

La hipótesis principal de este estudio es que la mutación V600E del gen *BRAF*, la metilación en el promotor del gen *P16* y la metilación conjunta de *P16* y *hMLH1*, denominada MET2, son marcadores moleculares con valor pronóstico en el CCR. Además, su estudio en conjunto con la MSI y las variables clínico-patológicas puede aportar información adicional a la clasificación del CCR y establecer criterios pronósticos en base a una combinación de los mismos. Esta utilidad puede ser más relevante para algún subgrupo de pacientes con características clínico-patológicas específicas.

La base de este estudio radica en que las mutaciones genéticas asociadas al CCR se agrupan y dan lugar a tres vías independientes implicadas en la tumorigénesis colorrectal. Los pacientes presentan una evolución distinta dependiendo de la vía que origine el tumor. De esta manera reconocemos tres subgrupos de pacientes:

- a. Pacientes con inestabilidad de microsatélites, que presentarían un pronóstico más favorable.

- b. Pacientes con inestabilidad cromosómica caracterizada por alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores. Este grupo presentaría peor pronóstico.
- c. Pacientes con patrones de metilación alterados en regiones promotoras de diversos genes, asociada a alteraciones en otros genes, *KRAS* y *BRAF* principalmente, y a MSI. Si se asocia con mutaciones en el gen *BRAF* el pronóstico es mejor que si se asocia con mutaciones en el gen *KRAS*.

BRAF es el componente principal de la vía de señalización intracelular RAS/RAF/MEK/ERK, alterada en algunos de los tumores colorrectales que se desarrollan por la vía MSI y por lo tanto será un buen indicador para identificar la presencia de este patrón modificador del pronóstico.

Tanto *P16* como *hMLH1* forman parte del grupo de 5 genes propuestos para definir el CIMP. La valoración de *P16* como de la variable MET2 pueden ser indicadores del desarrollo de los CCR por la vía de CIMP y de la presencia de un efecto en el pronóstico. Este efecto es modificable en función de otros factores, por este motivo la valoración conjunta con *BRAF* y MSI nos puede dar un perfil completo para la valoración de factores pronóstico moleculares.

PACIENTES Y MÉTODO

1. PACIENTES

1.1 PERIODO DE ESTUDIO

Este trabajo se realizó en el seno de un equipo multidisciplinario dedicado a la atención de pacientes diagnosticados de CCR, con la colaboración de los Servicios de Análisis Clínicos, Cirugía General y Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Los pacientes que forman parte de este estudio fueron intervenidos quirúrgicamente durante el periodo comprendido entre marzo de 1995 y mayo de 2003. El seguimiento de los pacientes se realizó hasta enero de 2010.

1.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. La población objeto de nuestro estudio se compone de un total de 326 pacientes consecutivos intervenidos quirúrgicamente por CCR. El diagnóstico fue confirmado por análisis histológico de la pieza de resección obtenida durante el acto quirúrgico en todos los casos.

Fueron excluidos de nuestro estudio los casos de carcinomas metacrónicos, las poliposis familiares, pacientes con criterios de HNPCC y la enfermedad inflamatoria intestinal. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento neoadyuvante.

Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes previo a la investigación (Anexo). Este estudio fue valorado favorablemente por el comité de ética e investigación clínica de este hospital.

2. MÉTODO

2.1 METODOLOGÍA CLÍNICA

El estudio de estos pacientes se llevó a cabo en tres etapas: etapa preoperatoria, etapa operatoria y etapa postoperatoria.

Durante la etapa preoperatoria se realizó a todos los pacientes, una historia clínica detallada así como los estudios radiológicos, determinaciones analíticas básicas y estudio endoscópico con la biopsia correspondiente, informada como carcinoma de intestino grueso.

La etapa operatoria incluyó la extracción quirúrgica del tumor y la obtención del tejido para la realización del estudio. Todos los pacientes fueron intervenidos por el mismo cirujano realizándose una cirugía radical oncológica en función de la localización del tumor. La cirugía se definió como curativa cuando tras la resección no existía evidencia de tumor macroscópico residual. Inmediatamente después de retirar la pieza se obtuvo una muestra del tumor de la zona macroscópicamente afectada y una muestra de tejido mucosa colorrectal sana alejada de la periferia del tumor, distanciada al menos 10 cm.

Las muestras de tejido se dividieron en dos fragmentos uno fue destinado al estudio histopatológico realizado en el Servicio de Anatomía Patológica y el otro se

almacenó a -80°C , hasta el momento de la determinación de las distintas alteraciones genéticas en el laboratorio.

Durante la etapa postoperatoria se realizó el estudio genético de las muestras tumorales y no tumorales y el seguimiento clínico de los pacientes con el objeto de analizar la posible influencia pronóstica de las alteraciones genéticas determinadas en los pacientes intervenidos de CCR.

A todos los pacientes se les realizó el seguimiento clínico según el protocolo establecido por el cirujano que intervino a los pacientes, valorándose la recidiva locorregional, metástasis a distancia y tumores metacrónicos.

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 92 meses con un rango intercuartílico entre $P_{25}=75$ y $P_{75}=111$ meses.

2.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA

2.2.1 Procesamiento de las muestras

Para el procesamiento de las muestras de tejido se siguieron los siguientes pasos: extracción y cuantificación del ADN, determinación de la mutación V600E del gen *BRAF* y determinación del estado de metilación del promotor del gen *P16*.

- Extracción del ADN

La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo basado en el método de extracción de ADN con fenol/cloroformo. El tejido se sometió a una incubación con el tampón de lisis y la proteinasa a 55°C durante toda una noche y tras varias etapas consecutivas de adición de fenol/cloroformo y centrifugación, se aisló el ADN por precipitación con etanol.

- Cuantificación del ADN

La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría. Se realizó una primera medición a 260 nm para cuantificar el ADN de doble hebra. Se aplicó la formula: $[\text{ADN}] = D_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución}$.

Se realizó una segunda medida a 280 nm para confirmar la pureza del ADN. Considerándose el ADN puro cuando la relación entre las absorbancias D_{260}/D_{280} está comprendida entre 1,8 y 2.

A continuación se congeló la dilución de ADN a -20°C hasta su posterior procesamiento.

2.2.2 Determinación de la mutación V600E del gen *BRAF*

La determinación de la mutación V600E del gen *BRAF* se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real basada en la técnica transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) y análisis de curvas de desnaturalización en un termociclador *LightCycler*® (ROCHE).

- Diseño de la técnica

Se utilizó la técnica FRET en un equipo de PCR a tiempo real (*LightCycler®*). La metodología FRET comprende 2 oligonucleótidos, uno de ellos está marcado con fluoresceína (FAM) en el extremo 3' y emite fluorescencia (emisor) y el otro absorbe la fluorescencia (receptor o *quencher*) y está marcado con otro fluoróforo, *LCRed*, en el extremo 5' (Figura 13).

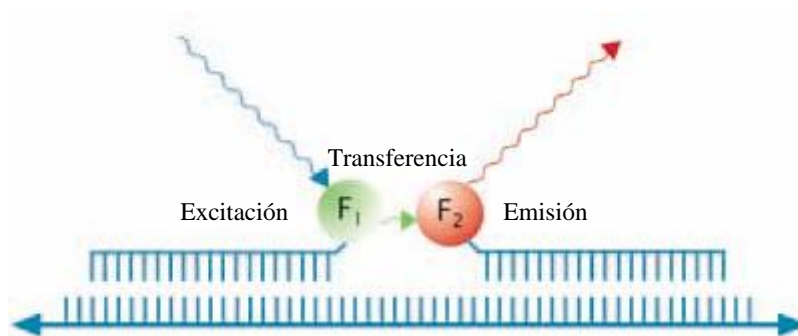


Figura 13: Esquema de la metodología FRET. Imagen tomada de: www.roche-applied-science.com

FAM absorbe la luz emitida por la fuente del *LightCycler®*, se excita, con una longitud de onda máxima de 494 nm y emite luz de una longitud de onda mayor, la fluorescencia. La fluorescencia es absorbida por *LCRed* en el espectro del rojo, hasta 640 nm. Si el emisor y el receptor están situados a menos de 5 nucleótidos no hay emisión de luz ya que el receptor absorbe la fluorescencia del emisor, cuando se separan, el receptor no puede absorber la luz emitida por el fluorocromo y esta fluorescencia es captada y cuantificada por el *LightCycler®*. La cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN generado durante la amplificación.

Los cebadores diseñados delimitan un fragmento de 231 pb que incluye la mutación a estudiar. Dicho fragmento comprende el exón 15 completo del gen *BRAF*, un fragmento intrónico en posición 5' y otro en posición 3'. La sonda marcada con *LcRed* cubre la posición de la mutación. Las sondas hibridan separadas solo por una base, permitiendo el fenómeno FRET. Por conveniencia termodinámica, el diseño de la sonda que cubre la posición de la mutación se ha realizado sobre la cadena complementaria, en vez de sobre la directa (secuencia más favorable para PCR) (Figura 14).

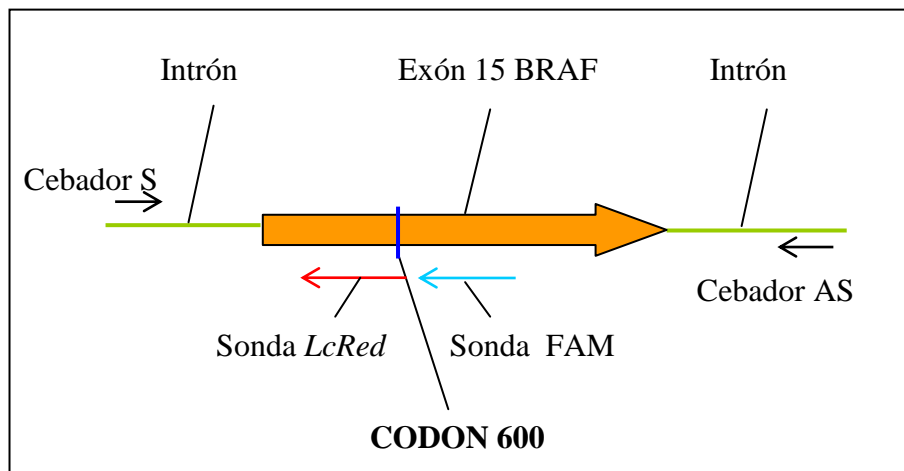


Figura 14: Esquema de la región amplificada y de la localización de los cebadores y de las sondas en el gen *BRAF*.

Una vez finalizada la amplificación en el *Ligthcycler*®, el producto se somete a calentamiento progresivo, lo que da lugar a una curva de desnaturalización que monitoriza la caída de fluorescencia generada (análisis de las curvas de desnaturalización o *melting*). La temperatura a la que se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia. Los productos de PCR de diferente longitud y secuencia se desnaturalizan a diferentes temperaturas, observándose picos

característicos de cada secuencia cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura frente a la temperatura. Esta diferencia en los picos discrimina las secuencia del ADN y por tanto las muestras portadoras de la mutación estudiada.

- Procedimiento

La amplificación del fragmento del gen *BRAF* se realizó usando el kit *LC Master Hybridization Probes* (Roche). Se preparó la mezcla de reacción con un volumen total de 20 µL compuesto de: 30 ng de ADN tumoral, 0,5 µM de cada cebador, 0,25 µM de cada sonda, 3 mM de MgCl₂ y 2 µl de la mezcla *Fast Start ADN* incluida en el kit y que contiene un tampón específico para la PCR, la ADN polimerasa y los dinucleótidos trifosfato (Tabla XV).

Tabla XV: Secuencias de los cebadores y de las sondas utilizados en la determinación de la mutación V600E del gen *BRAF*²⁴³.

| | | |
|-----------|-------------------------|---|
| Cebadores | <i>BRAF</i> sentido | 5'-CTACTGTTTCCTTTACTTACTACAC-3' |
| | <i>BRAF</i> antisentido | 5'-GACCTTCAATGACTTTCTAGTAAC-3' |
| Sondas | Sonda FAM | 5'-AGATTTCACTGTAGCTAGACCAAA-3'-FAM |
| | Sonda <i>LCRed</i> | <i>LCRed</i> 5'-TCACCTATTTTACTGTGAGGTCTTCATG-3' |

La mezcla de reacción se sometió a un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C y posteriormente a 45 ciclos de amplificación en los que cada uno de ellos comprendía: 2 segundos a 95°C para la desnaturalización de la doble hélice, 10 segundos a 55°C para la hibridación y 10 segundos a 72°C para la síntesis de la cadena del ADN. El análisis

melting se realizó con un ciclo de 3 temperaturas: 1 segundo a 95°C, 60 segundos a 40°C y 0,1 segundos a 70°C.

Con el diseño descrito, las secuencias no mutadas mostraron una temperatura de *melting* superior (61,5°C), y las mutadas un pico a 4,5°C por debajo (57°C) (Figura 15).

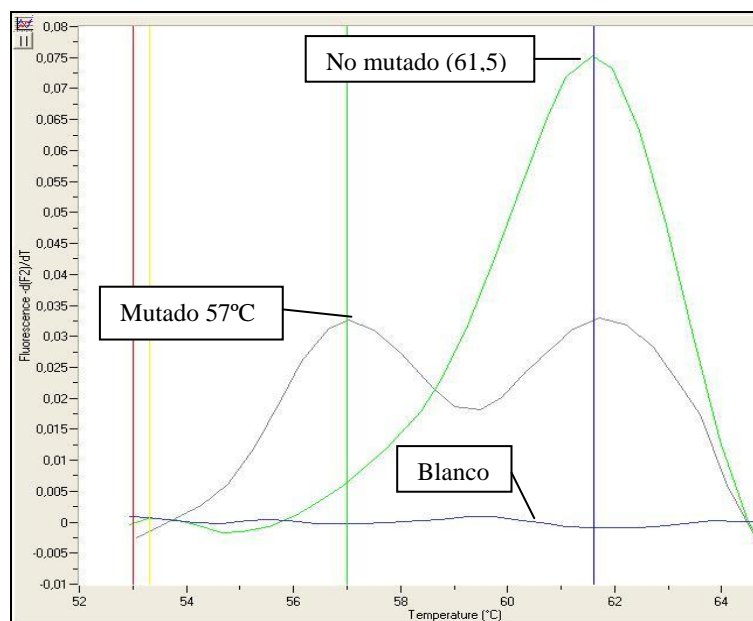


Figura 15: Análisis de *melting* para la determinación de la mutación V600E.

2.2.3 Determinación del estado de metilación del promotor del gen *P16*

El estudio de la metilación del promotor del gen *P16* se realizó mediante tratamiento del ADN con bisulfito sódico y amplificación del ADN mediante PCR cuantitativa específica de metilación (qMSP).

- Diseño de la técnica
 - Tratamiento con bisulfito

Para poder determinar el estado de metilación es necesario modificar el ADN por tratamiento con bisulfito sódico. El bisulfito sódico transforma las citosinas sin metilar en uracilos sin alterar las citosinas metiladas. Este tratamiento con bisulfito requiere una desnaturalización inicial con tratamiento alcalino (NaOH) para separar las dos hebras de ADN y posteriormente una modificación con bisulfito sódico que se produce en 3 pasos: sulfonación, desaminación y desulfonación. (Figura 16).

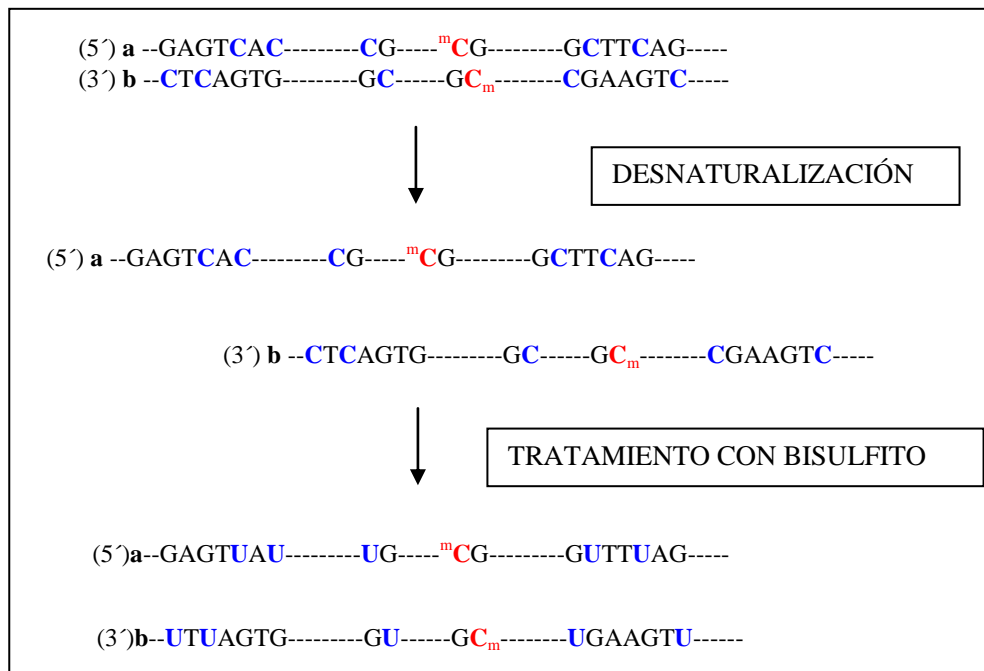


Figura 16: Secuencia del tratamiento con bisulfito.

- qMSP

El ADN tratado con bisulfito se amplificó mediante qMSP en un termociclador a tiempo real *Smart Cycler*® (CEPHEID), usando sondas tipo TaqMan.

La qMSP se basa en un diseño de cebadores y de sondas específico para el ADN sometido al bisulfito. Los cebadores y la sonda deben discriminar los cambios en las citosinas no metiladas y además incluir suficientes islas CpG para poder discriminar si hay o no metilación en ese fragmento (Figura 17).

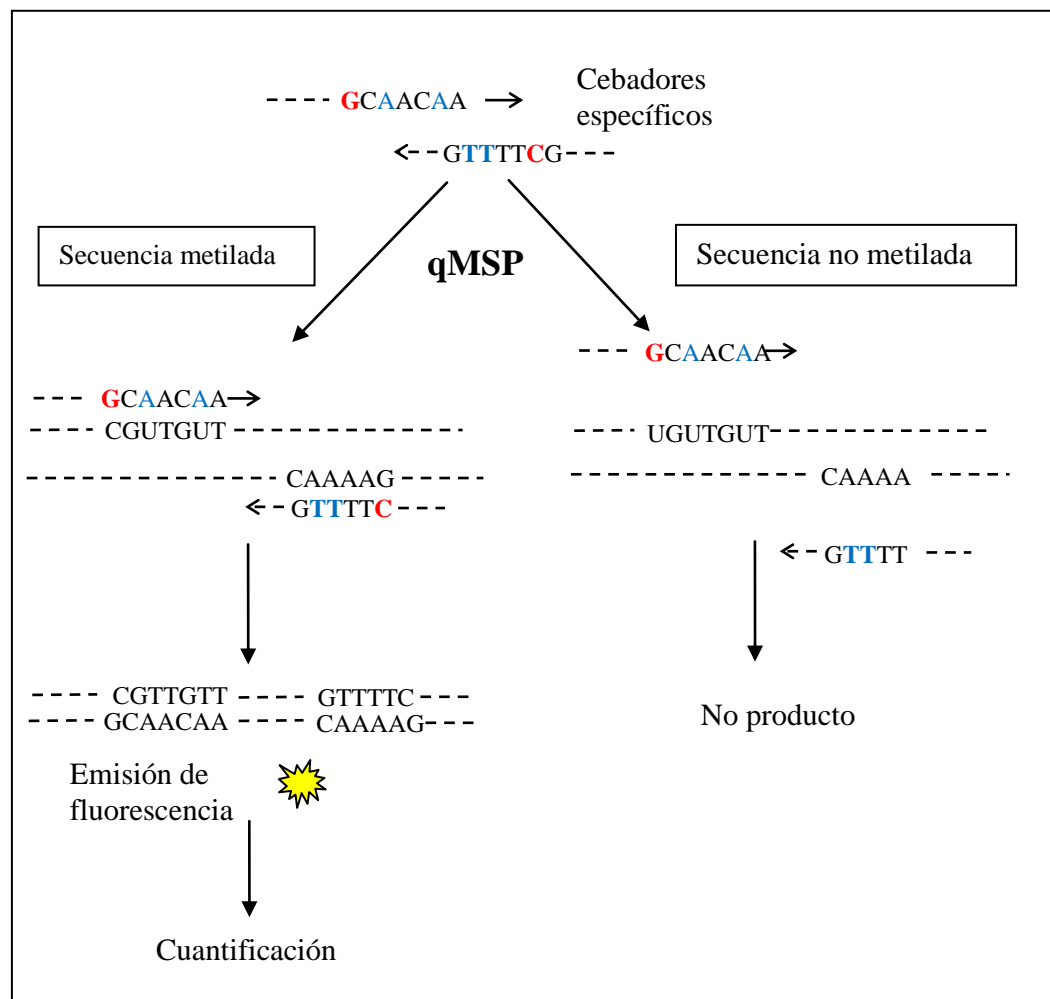


Figura 17: Esquema de la qMSP.

Las sondas tipo TaqMan se basan en un único oligonucleótido marcado con dos fluorocromos para cuantificar los productos de la PCR. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo, emisor de fluorescencia, en su extremo 3' y una molécula en el extremo 5'

(*Black Hole quencher* o BHQ) que bloquea la emisión de fluorescencia (receptor). Esta metodología cuenta con la misma base teórica que la explicada para el análisis del gen *BRAF* aunque en este tipo de sondas la distancia entre ambas moléculas puede ser mayor de 5 nucleótidos para que se mantenga el silenciamiento de la fluorescencia.

La sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de la PCR delimitado por los cebadores diseñados. Durante la PCR la sonda hibrida en el ADN, pero, debido a la cercanía entre el fluoróforo y el receptor, no se emite fluorescencia. Cuando la polimerasa llega a la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo que provoca la separación del fluorocromo y del receptor y, por tanto, la emisión de fluorescencia. La cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN generado durante la amplificación²⁴⁴ (Figura 18).

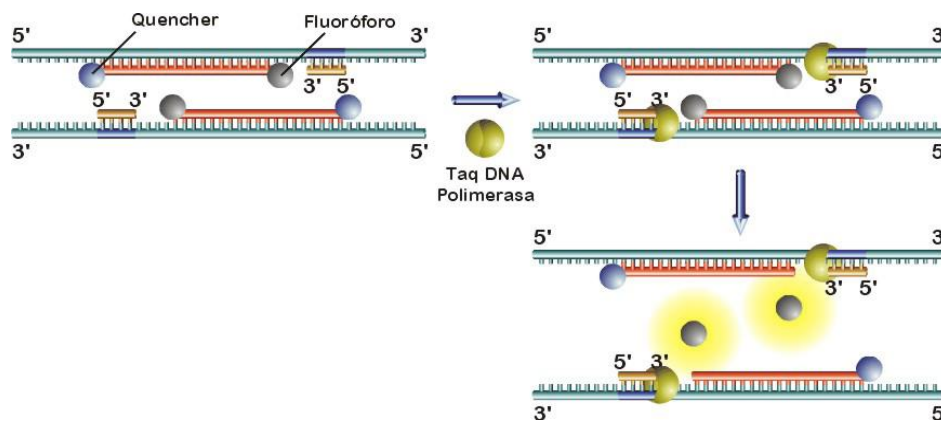


Figura 18: Esquema del funcionamiento de las sondas tipo TaqMan. Imagen tomada de: www.asuragen.com

La fluorescencia se mide durante la fase de hibridación/extensión de cada ciclo de amplificación para determinar el ciclo umbral (Ct) de la reacción. El Ct es aquel en el que se produce un aumento significativo de la señal de fluorescencia asociada con un

crecimiento exponencial del producto de la PCR. Este punto nos da la información más importante sobre la reacción, ya que la relación entre el valor Ct del gen de interés y el gen de referencia interna mide, en este caso, el nivel relativo de metilación (RML) de cada muestra (gen de interés/ gen de referencia).^{245,246}

- Procedimiento

- Modificación con bisulfito

Para realizar el tratamiento con bisulfito usando el kit *Epitect Bisulfite* (Qiagen). La modificación se realizó en un volumen final de 140 µl. La mezcla de reacción se compuso de 1µg de ADN, de 85µl de *Bisulfite Mix* y 35 µl de tampón protector. Esta mezcla se sometió a 3 series de desnaturalización a 99°C para la separación de las 2 cadenas del ADN e incubación a 60°C para la sulfonación y la desaminación de las citosinas. El último paso, la desulfonación, se llevó a cabo en las columnas donde se realiza la purificación del ADN modificado.

- qMSP

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl usando el kit *QuantiTect Probe PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). La mezcla de reacción se compuso de: 1 µl de ADN modificado, 10 pmol de cada cebador, 5 pmol de sonda marcada y 12,5 µl de la mezcla enzimática incluida en el kit. Se realizaron dos amplificaciones independientes y para cada muestra de ADN, una para el gen *P16* y otra para el gen de referencia, usando en cada una los cebadores y sondas correspondientes²⁴⁷ (Tabla XVI).

Se uso como gen de referencia interno el gen de diferenciación miogénica (*MYOD1*). En este gen se amplificó una secuencia libre de islas CpG, y por tanto independiente del estado de metilación, así, se verificó la calidad de las muestras de ADN y la efectividad de la modificación.

Tabla XVI: Secuencias de cebadores y sondas usadas en la determinación de la metilación de *P16*.

| | | |
|----------------------------------|------------------|---|
| Cebadores <i>P16</i> | Sentido | 3'-TGGAGTTTTCGGTTGATTGGTT-5' |
| | Antisentido | 3'-TCCTCCACGCCCAACAA-5' |
| Sonda <i>P16</i> | Sonda <i>P16</i> | FAM-3'-GCGCCAAGCCCCAGCCCA-5'-BHQ1 |
| Cebadores <i>MYOD1</i> | Sentido | 3'-TGATTAAATTTAGATTGGGTTTAGAGAAGGA-5' |
| | Antisentido | 3'-TATCTCTCCCCTAACCTCAACC-5' |
| Sonda <i>MYOD1</i> | Sonda | TX-RED 3'GGAGGTATTAGGTTGGATTAGGAATA GGAAGGGA-5'-BHQ2 |

En la tabla XVI las timinas/adeninas de color azul de los cebadores y de las sondas indican las citosinas que se modifican en la secuencia de ADN tras el tratamiento con bisulfito por no estar metiladas. Las citosinas/guaninas de color rojo señalan las citosinas metiladas por estar incluidas en las islas CpG.

El fluoróforo usado en la reacción del gen *P16* fue FAM que tiene un espectro máximo de excitación y emisión de 494 nm y 518 nm respectivamente. FAM se silencio en la ausencia de amplificado con BHQ1 que tiene su máxima absorbancia a 534 nm y un rango de silenciamiento 480-580 nm En la reacción del gen *MYOD1* el fluoróforo usado fue *Texas Red* que tiene un espectro máximo de excitación y emisión de 596 nm y 615 nm respectivamente. Esta fluorescencia se silenció en ausencia de amplificado

con BHQ2 que tiene su máxima absorbancia a 579 nm y un rango de silenciamiento de 550-650 nm.

La mezcla de reacción se sometió a un ciclo inicial de 15 minutos a 95°C y posteriormente a 45 ciclos de amplificación en los que cada uno de ellos comprendía: 15 segundos a 95°C para la desnaturalización de la doble hélice, 30 segundos a 61°C para la hibridación y 30 segundos a 72°C para la síntesis de la cadena del ADN.

En cada reacción de amplificación se incluyeron un control negativo y uno positivo para la metilación para evaluar la eficacia de la reacción y para poder establecer los puntos de corte de la metilación. Como control positivo se utilizó el ADN metilado *in vitro* CpGenome™ Universal Methylated ADN (Chemicon), y como control negativo se utilizó ADN de leucocitos de varón sin patología, que no presentan metilación.

Se determinó el RML analizando la relación entre el valor Ct del gen *P16* y del gen *MYOD1* para cada muestra y para los controles positivo y negativo. El punto de corte del RML en este estudio fue de 1,0 para la metilación *P16*. Los valores RML menores de 1,0 indican metilación de la secuencia promotora analizada en *P16*.

2.3 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media y desviación estándar (DE). La variable

edad es recodificada en dos grupos de acuerdo con la mediana (71 años). En distribuciones asimétricas se presenta la mediana y su rango intercuartílico.

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de χ^2 y, en el caso de que un 25% o más de los esperados fueran menores de 5, por la prueba exacta de Fisher.

Se analizó el comportamiento de las variables cuantitativas por cada una de las variables independientes categorizadas mediante el test de la t de Student y/o el análisis de la variancia. En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de variancias. Se corrigió el nivel de significación para contrastes múltiples con el test de Bonferroni.

Se estimaron las funciones de SG y supervivencia libre de enfermedad (SLE), por el método de Kaplan-Meier, para los factores clínico-patológicos y las alteraciones genéticas estudiadas.

En el análisis de la SG se definieron como eventos las muertes producidas como consecuencia del tumor, censurándose los pacientes vivos y aquellos que fallecieron por otras causas. La SG fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la de la muerte o la última revisión registrada.

En la SLE el evento fue definido como el diagnóstico de recidiva locorregional o recurrencia a distancia en los pacientes previamente libres de enfermedad. La SLE fue

calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de cirugía y la del diagnóstico de la primera recidiva.

La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizó mediante el test exacto de Breslow. Este test consiste en comparar el número de eventos observados en cada uno de los subgrupos con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula).

Se realizó un análisis estratificado para estudiar la relación entre las alteraciones genéticas estudiadas y los eventos, con el fin de detectar confusión e interacción, por las variables clínicas.

Se ajustó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox, que permite identificar y evaluar la relación entre las alteraciones genéticas estudiadas y el tiempo de ocurrencia de la muerte y la recidiva.

Se evaluó la existencia de interacciones, introduciendo las variables independientes multiplicativas con pruebas de significación estadística y se mantienen en el modelo los términos de interacción estadísticamente significativos. Se presentan los “razones de tasas” ajustados junto a sus intervalos de confianza al 95%. La interpretación de los parámetros del modelo con signos positivos indica un aumento de la tasa instantánea de riesgo, es decir, un peor pronóstico del sujeto para un valor alto de

la variable x . Un parámetro con signo negativo indica mejor pronóstico para un valor alto en la variable.

Los supuestos básicos que deben de cumplir los datos para poder aplicar dicho modelo son sobre todo de la parte paramétrica ya que la contribución de las diferentes variables explicativas en la predicción de la supervivencia, o más precisamente, de la tasa instantánea de riesgo, es la misma en cualquier momento de tiempo de seguimiento. La parte no paramétrica del modelo no impone ningún supuesto sobre la forma de distribución de los tiempos de supervivencia. Se han comprobado los supuestos del modelo.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 12.0.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

La cohorte estudiada comprende un total de 326 pacientes, 174 varones y 152 mujeres intervenidos de CCR. La media de edad fue de 70,1 años, con una desviación estándar de 11 y una mediana de 71 años (rango intercuartílico $P_{25}=63$ y $P_{75}=78$).

CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES

Localización

Respecto a la localización del tumor, 205 estaban situados en colon (62,9%) y 121 en recto (37,1%). Los 205 tumores de colon se localizaron: 85 en el colon derecho (26,1%), 19 en el colon transverso (5,8%), 16 en el colon izquierdo (4,9%) y 85 en sigma (26,1%) (Figura 19).

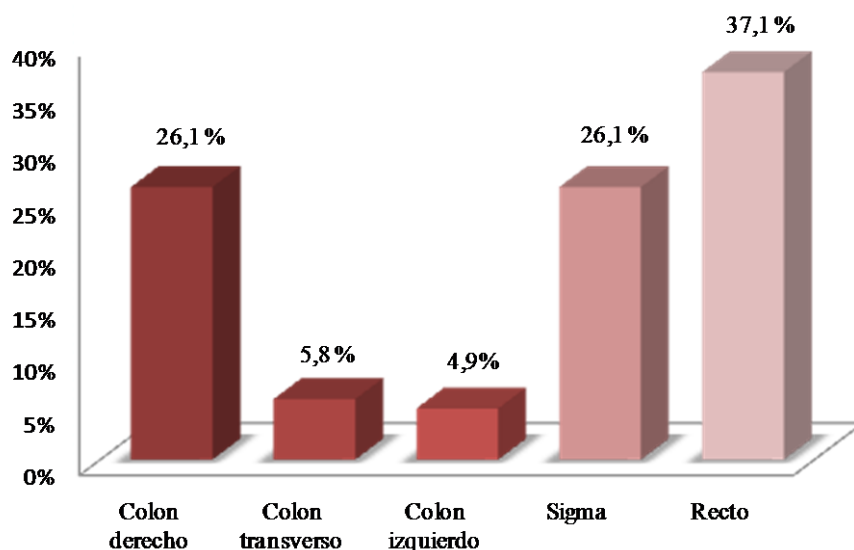


Figura 19: Distribución de tumores colorrectales según la localización.

Tipo histológico

La distribución de los 326 tumores colorrectales respecto al tipo histológico de acuerdo con la clasificación de la OMS²⁴⁷ fue: 298 adenocarcinomas (91,4%) y 28 adenocarcinomas mucinosos (8,6%) (Figura 20).

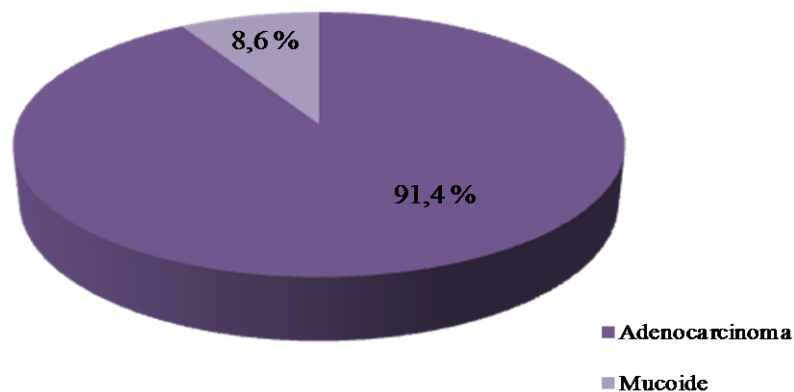


Figura 20: Distribución de tumores colorrectales según el tipo histológico.

Estadio tumoral

Según la clasificación de Dukes,¹⁴⁷ nuestro grupo de pacientes se distribuyó en: 12 en estadio A (3,7%), 162 en estadio B (47,9 %), 81 en estadio C (24,8%) y 71 en estadio D (21,8%) (Figura 21).

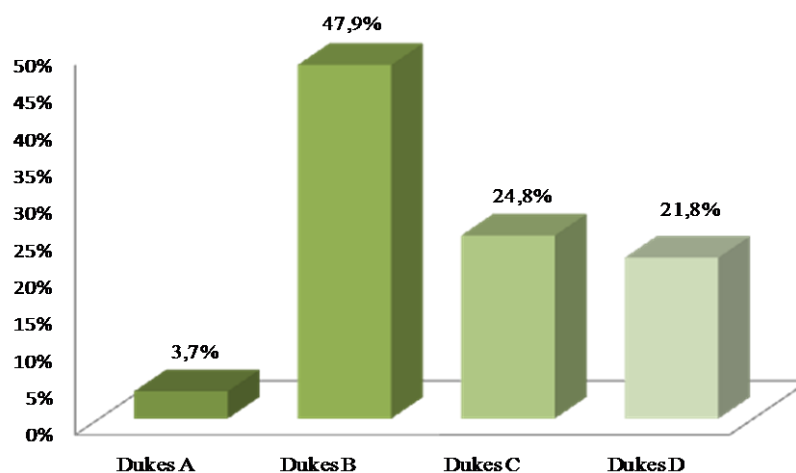


Figura 21: Distribución de tumores colorrectales según el estadio.

Grado de diferenciación celular

Respecto al grado de diferenciación, los tumores se distribuyeron según la clasificación de Grinnell²⁴⁹ en tres grupos: 212 tumores (65,0%) bien diferenciados, 66 (20,2%) moderadamente diferenciados y 13 (3,9%) indiferenciados. En 35 de los 326 tumores no se pudo determinar el grado de diferenciación (Figura 22).

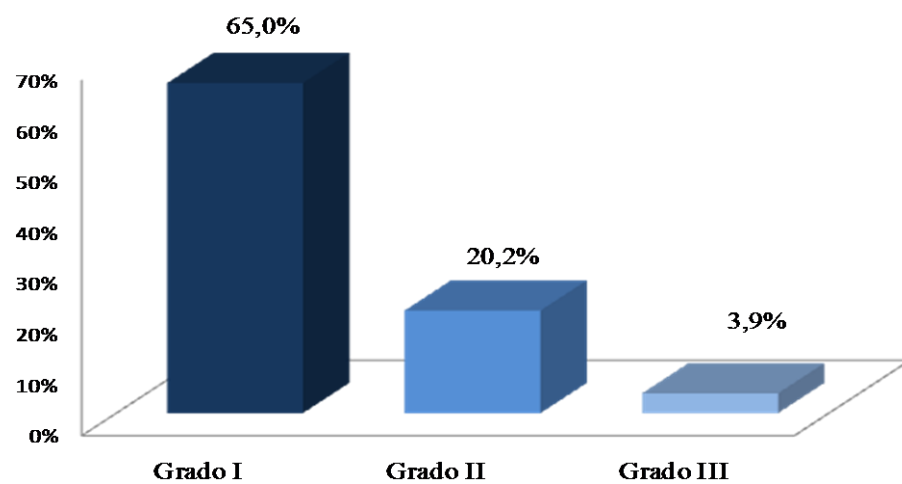


Figura 22: Distribución de tumores colorrectales según el grado de diferenciación.

Cirugía

En todos los casos los pacientes fueron sometidos a intervención quirúrgica. La cirugía realizada fue curativa en 269 pacientes (82,5%) y paliativa en 57 pacientes (17,5%).

2. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* Y LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *P16*

2.1. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF*

El estudio de la mutación del gen *BRAF* fue realizado en 304 pacientes, de los cuales, el 4,3% (13/304) presentaba la mutación y el 95,7% (291/304) no presentaba la mutación. En 22 pacientes no se pudo analizar la mutación por daños en el ADN.

2.2. ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *P16*

El estudio de la metilación del promotor del gen *P16* fue realizado en 318 pacientes. El 24,8% (79/318) presentaba metilación de la región promotora, y en el 75,2% (239/318) no se observó metilación. En 8 pacientes no se pudo determinar el estado de metilación por daños en el ADN.

3. ANÁLISIS DE LA VARIABLE MET2

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN LA QUE SE HA EVALUADO MET2

La población en la que se evalúa la variable MET2 está formada por 51 pacientes en los que se ha analizado tanto la metilación del promotor del gen *hMLH1* como la del promotor del gen *P16*. Esta población se compone de un total de 22 varones y 29 mujeres diagnosticados de CCR. La media de edad fue de 70,7 años, con una desviación estándar de 13,9 y una mediana de 73 años (rango intercuartílico $P_{25}=63$ y $P_{75}=80$).

CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES

Localización del tumor

Respecto a la localización tumoral 41 tumores se localizaron en colon (80,4%) y 10 en recto (19,6%). Los 41 tumores localizados en el colon se distribuyeron: 24 en colon derecho (47,1%), 5 en colon transverso (9,8%), 3 en colon izquierdo (5,9%) y 9 en sigma (17,6%) (Figura 23).

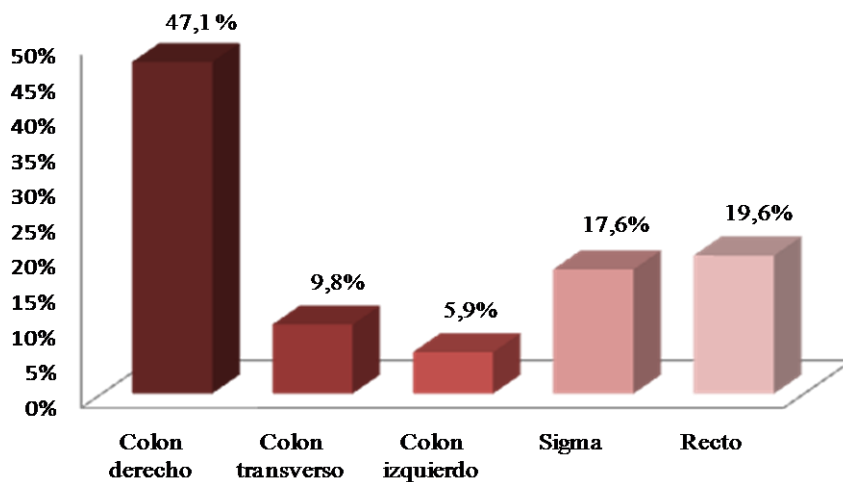


Figura 23: Distribución de tumores colorrectales según la localización en la población de pacientes analizados para la variable MET2.

Tipo histológico

Respecto al tipo histológico de acuerdo con la clasificación de la OMS²⁴⁸ 46 de los tumores colorrectales fueron adenocarcinomas (90,2%) y 5 fueron mucoides (9,8%) (Figura 24).

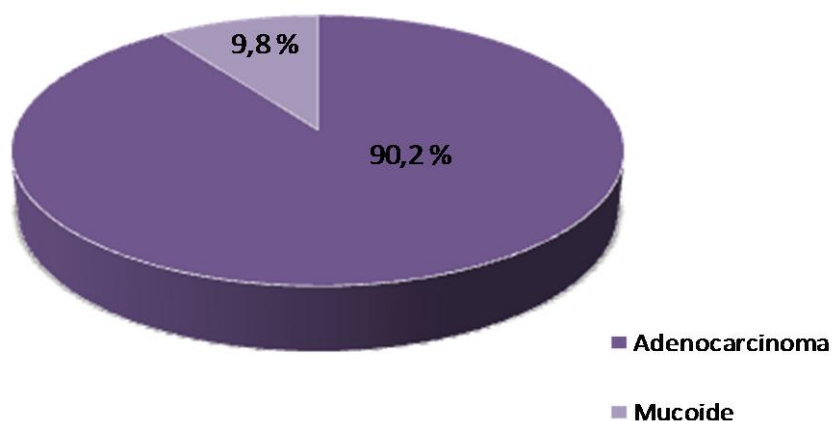


Figura 24: Distribución de tumores colorrectales según el tipo histológico en la población de pacientes analizados para la variable MET2.

Estadio tumoral

Según la clasificación de Dukes,¹⁴⁷ los tumores se distribuyeron en: 2 en estadio A (3,9%), 27 en estadio B (52,9%), 14 en estadio C (27,5%) y 8 en estadio D (15,7%) (Figura 25).

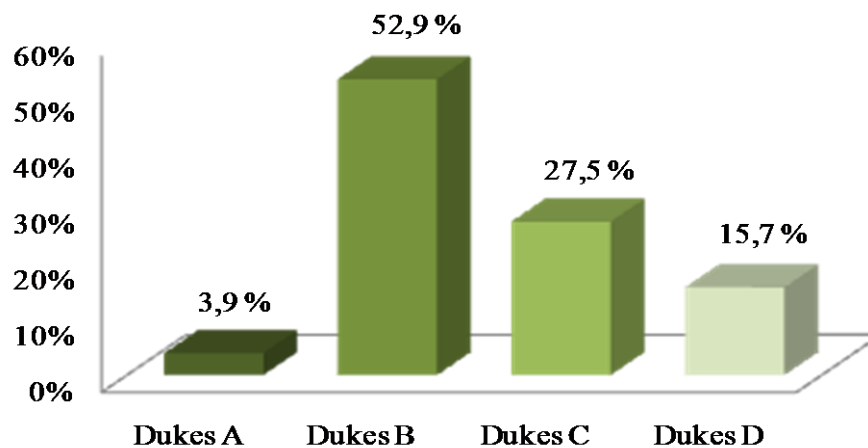


Figura 25: Distribución de tumores colorrectales según el estadio en la población de pacientes analizados para la variable MET2.

Grado de diferenciación

Respecto al grado de diferenciación, los tumores se distribuyeron según la clasificación de Grinnell¹⁶² en tres grupos: 31 tumores bien diferenciados (60,8%), 12 tumores moderadamente diferenciados (23,5%) y 4 tumores indiferenciados (7,8%). En 4 tumores no se pudo determinar el grado de diferenciación (Figura 26).

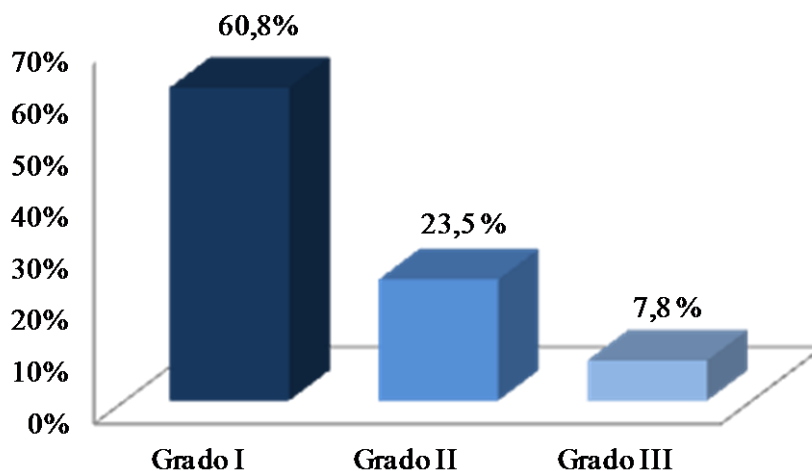


Figura 26: Distribución de tumores colorrectales según el grado de diferenciación en la población de pacientes analizados para la variable MET2.

Cirugía

La cirugía realizada fue curativa en 46 pacientes (90,2%) y paliativa en 5 pacientes (9,8%).

3.2. ESTUDIO DE LA VARIABLE MET2

El estudio de la metilación en *hMLH1* y *P16* fue realizado en 51 pacientes, todos ellos MSI. El 33,3% (17/51) presentaba metilación de la región promotora de ambos genes, y en el 66,6% (34/51) no se observó metilación conjunta.

4. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF*, DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *P16* Y DE LA VARIABLE MET2 CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

4.1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

El estudio de la relación de la mutación V600E con las variables clínico-patológicas mostró que no existía asociación significativa entre la mutación y el sexo de los pacientes, aunque se observó mayor frecuencia de tumores con esta mutación en las mujeres. De los 174 hombres estudiados el 3,1% presentó alteración en el gen *BRAF* y el 96,9% no la presentó. De las mujeres el 5,6% presentó la mutación y el 94,4% no la presentó ($p=0,27$) (Tabla XVII).

No se encontró ninguna relación entre la edad de los pacientes y la mutación V600E. En los pacientes con edad mayor o igual a 71 años, el 4,7% presentaba la mutación y en el 95,3% no. En los menores de 71 años, en el 3,4% se detectó la mutación y en el 96,6% no se detectó ($p=0,49$).

Respecto al estadio tumoral, tampoco se observó relación significativa. Los tumores en estadios precoces se distribuyeron: 3,7% mutado y 96,3% no mutado. En los tumores en estadio C: 5,5% mutado y 94,5% no mutado. En el estadio D, el 4,3% de los tumores presentaron la mutación y el 95,7% no la presentaron ($p=0,67$).

Se observó relación estadísticamente significativa entre la mutación V600E y la localización del tumor, siendo más frecuente la mutación del gen *BRAF* en colon proximal que en colon distal y recto. Los localizados en el colon proximal presentaron la mutación en el 12,4%, y no la presentaron el 87,6%. De los tumores de colon distal la mutación se presentó en el 0,9%, mientras que el 99,1% no la presentó. En el recto no se observó la mutación en ninguno de los tumores. ($p<0,001$) (Figura 27).

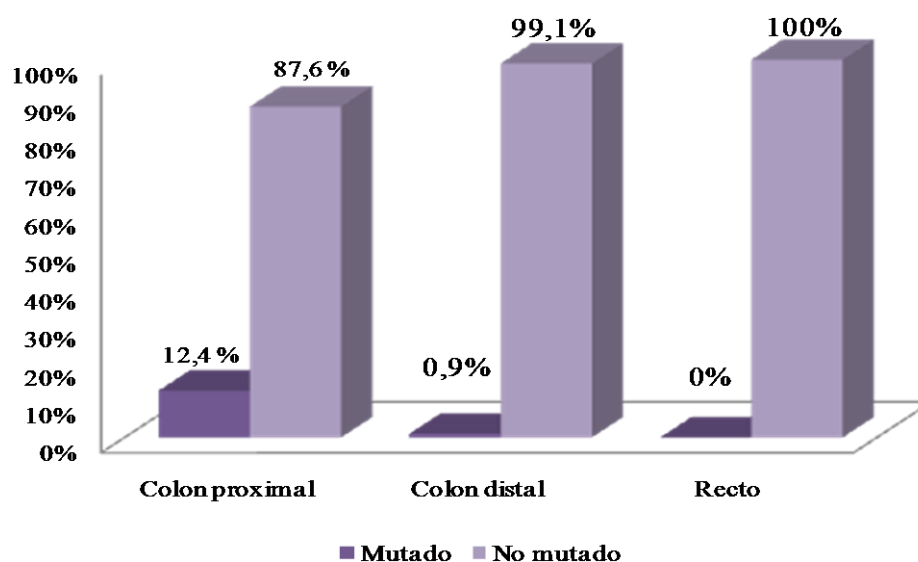


Figura 27: Distribución del porcentaje de la mutación V600E del gen *BRAF* según la localización de los tumores colorrectales.

En el estudio de la relación de la mutación del gen *BRAF* con el tipo histológico, el 3,8% de los adenocarcinomas presentaron la mutación y el 96,2% no la presentaron. De los tumores mucoides el 8,0% tuvo la mutación y el 92,0% no la tuvo ($p=0,29$). Aunque la relación no es estadísticamente significativa, se observó una mayor incidencia de la mutación del gen *BRAF* en los tumores con componente mucoso.

El estudio de la relación de la mutación V600E con el grado de diferenciación no mostró relación significativa, aunque se observó una mayor frecuencia de la mutación en los tumores pobremente diferenciados. Los tumores de grado I presentaron la mutación en el 2,6% de los casos y no presentaron la mutación en el 97,4% de los casos. En los de grado II se observó la mutación en el 6,5% y su ausencia en el 93,5%. En los tumores de grado III se presentó la mutación en el 8,3% y no se presentó en el 91,7% ($p=0,1$).

Tabla XVII: Prevalencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en relación con las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos en la serie de pacientes con CCR.

| Variable | n (%) | Mutado | No mutado | p |
|--------------------------------|--|----------------------------------|---|------------------|
| Sexo | Hombres: 174 (53,4%) Mujeres: 152 (46,6%) | 5 (3,1%) 8 (5,6%) | 157 (96,9%) 134 (94,4%) | 0.27 |
| Edad | ≥ 71 años: 170 (52,1%) < 71 años: 156 (47,9%) | 8 (4,7%) 5 (3,4%) | 151 (95,3%) 140 (96,6%) | 0.49 |
| Dukes | A+B: 174 (53,4%) C: 81 (24,8%) D: 71 (21,8%) | 6 (3,7%) 4 (5,5%) 3 (4,3%) | 156 (96,3%) 69 (94,5%) 66 (95,7%) | 0,67 |
| Localización | Colon proximal: 104 (31,9%) Colon distal: 101 (30,9%) Recto: 121 (37,9%) | 12 (12,4%) 1 (0,9%) 0 (0%) | 85 (87,6%) 96 (99,1%) 110 (100%) | <0,001 |
| Tipo histológico | Adenocarcinoma: 289 (91,4%) Mucoide: 28 (8,6%) | 11 (3,8%) 2 (8,0%) | 267 (96,2%) 23 (92,0%) | 0.29 |
| Grado de diferenciación | I: 212 (65,0%) II: 66 (20,1 %) III: 13 (3,9%) | 5 (2,6%) 4 (6,5%) 1 (8,3%) | 191 (97,4%) 58 (93,5%) 11 (91,7%) | 0.10 |

4.2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *P16* CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

El estudio de la relación del estado de metilación del promotor del gen *P16* con las variables clínico-patológicas mostró que en el caso del sexo de los pacientes no existía relación significativa. De los 174 hombres en los que se ha analizado esta alteración, el 26,2% presentaba metilación del promotor y el 73,8% no presentaba metilación. En las mujeres el 23,3% presentaba metilación y el 76,7% no mostró metilación ($p=0,55$) (Tabla XVIII).

No se observó relación significativa entre la edad de los pacientes y la metilación del gen, aunque se observó mayor frecuencia de metilación en *P16* en el grupo de mayor edad. En los pacientes con edad superior o igual a 71 años, el 29,1% mostraba metilación y el 70,9% no presentaba metilación. En los pacientes con edad inferior a 71 años se observó metilación en el 20,3% y no presentó metilación el 79,7% ($p=0,06$) (Figura 28).

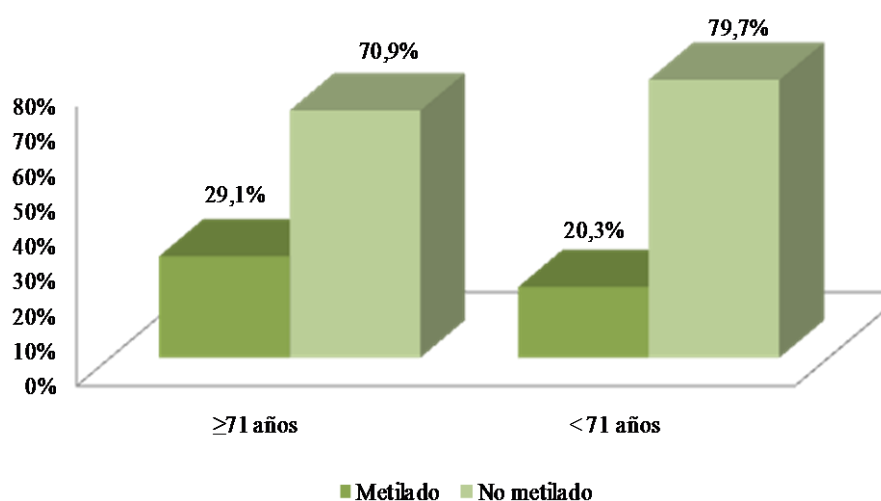


Figura 28: Distribución del porcentaje de la metilación del gen *P16* según la edad de los pacientes con CCR.

Con respecto al estadio tumoral, tampoco se encontró relación significativa. Los tumores en estadios iniciales presentaron metilación en el 22,1% de los casos y el 77,9% no presentó metilación. En los tumores en estadio C se observó un 23,4% de metilación y un 76,6% de ausencia de metilación. En el estadio D, el 33,3% de los tumores presentaron metilación y el 66,7% no presentó metilación ($p=0,17$).

Se observó relación estadísticamente significativa con la localización del tumor. La metilación era más frecuente en el colon proximal (32,4%) que en los tumores localizados en colon distal (15,8%) y en recto (25,9%) ($p=0,02$) (Figura 29).

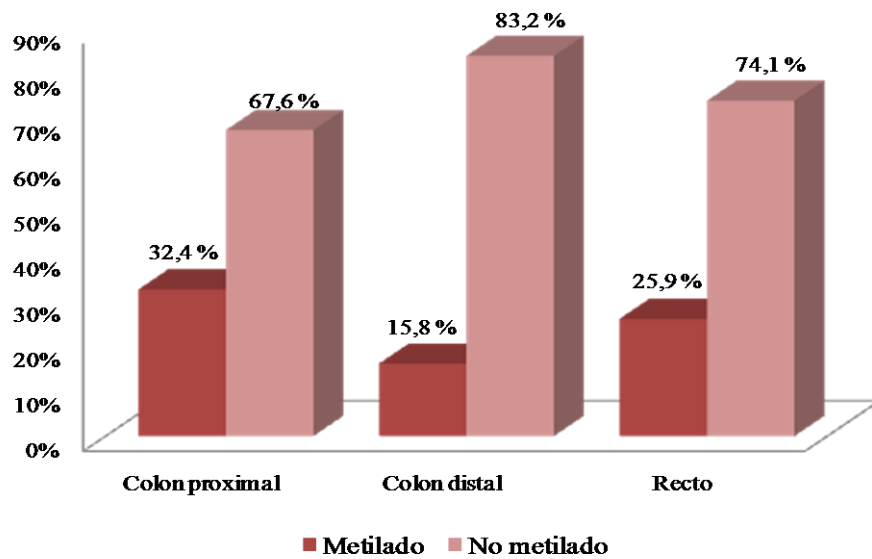


Figura 29: Distribución del porcentaje de la metilación del gen *P16* según la localización de los tumores colorrectales.

No se observó relación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y el estado de metilación. Los adenocarcinomas presentaban metilación en el 25,1% de los casos y no presentaban metilación en el 74,9%. Los de tipo mucinoso presentaron metilación en el 19,2% de los casos, y no la presentaron el 80,8% ($p=0,5$).

Se observó relación estadísticamente significativa en el estudio de la relación del grado de diferenciación y la metilación. La metilación de *P16* es más frecuente en los tumores menos diferenciados. La metilación en los tumores de grado I fue del 21,7% y la ausencia de metilación del 78,3%. En los tumores de grado II el 24,6% presentaba metilación y el 75,4% no presentaba metilación. Los tumores de grado III presentaban metilación en el 69,2% y ausencia de metilación en el 30,8% ($p=0,001$) (Figura 30).

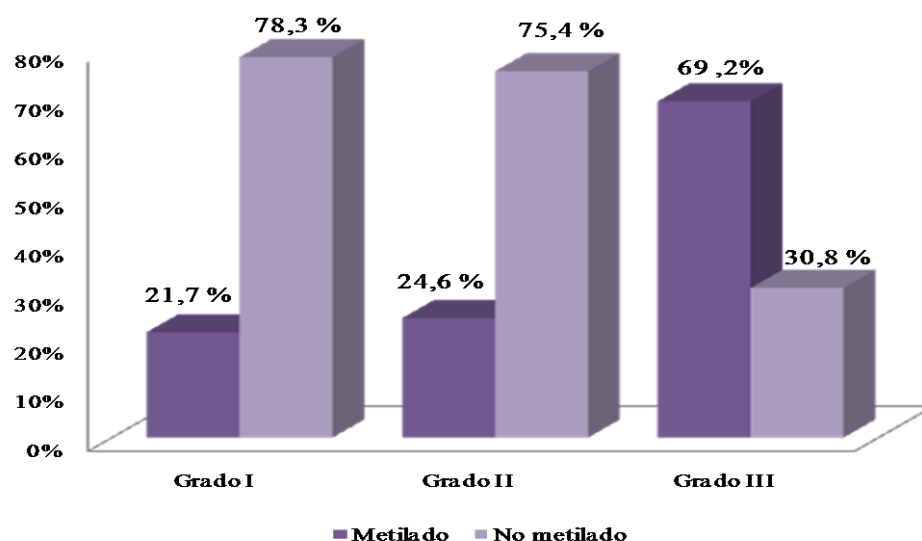


Figura 30: Distribución del porcentaje de la metilación del gen *P16* según el grado de diferenciación de los tumores colorrectales.

Tabla XVIII: Prevalencia de la metilación del promotor de *P16* en relación con las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos en la serie de pacientes con CCR.

| Variable | n (%) | Metilado | No metilado | P |
|--------------------------------|-----------------------------|------------|-------------|--------------|
| Sexo | Hombres: 174 (53,4%) | 44 (26,2%) | 124 (73,8%) | 0,55 |
| | Mujeres: 152 (46,6%) | 35 (23,3%) | 115 (76,7%) | |
| Edad | ≥ 71 años: 170 (52,1%) | 48 (29,1%) | 117 (70,9%) | 0,06 |
| | < 71 años: 156 (47,9%) | 31 (20,3%) | 122 (79,7%) | |
| Dukes | A+B: 174 (53,4%) | 38 (22,1%) | 134 (77,9%) | 0,17 |
| | C: 81 (24,8%) | 18 (23,4%) | 59 (76,6%) | |
| | D: 71 (21,8%) | 23 (33,3%) | 46 (66,7%) | |
| Localización | Colon proximal: 104 (31,9%) | 33 (32,4%) | 69 (67,6%) | 0,02 |
| | Colon distal: 101 (30,9%) | 16 (15,8%) | 84 (83,2%) | |
| | Recto: 121 (37,9%) | 30 (25,9%) | 86 (74,1%) | |
| Tipo histológico | Adenocarcinoma: 289 (91,4%) | 73 (25,1%) | 218 (74,9%) | 0,5 |
| | Mucoide: 28 (8,6%) | 15 (19,2%) | 21 (80,8%) | |
| Grado de diferenciación | I: 212 (65,0%) | 45 (21,7%) | 162 (78,3%) | 0,001 |
| | II: 66 (20,2%) | 16 (24,6%) | 49 (75,4%) | |
| | III: 13 (3,9%) | 9 (69,2%) | 4 (30,8%) | |

4.3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA VARIABLE MET2 CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

El estudio de la relación de la variable MET2 con las variables clínico-patológicas mostró que en el caso del sexo de los pacientes no existía relación significativa. De los 22 hombres en los que se ha analizado esta alteración, el 22,7% presentaba metilación simultánea de *hMLH1* y *P16* y el 77,3% no presentaba metilación. En las mujeres el 41,4% presentaba metilación y el 58,6% no mostró metilación ($p=0,16$) (Tabla XIX).

No se observó relación significativa entre la edad de los pacientes y MET2, aunque se observó mayor frecuencia de metilación MET2 en el grupo de mayor edad. En los pacientes con edad superior o igual a 71 años, el 42,4% mostraba metilación y el 57,6% no presentaba metilación. En los pacientes con edad inferior a 71 años se observó metilación en el 16,7% y no presentaban metilación el 83,3% ($p=0,06$) (Figura 31).

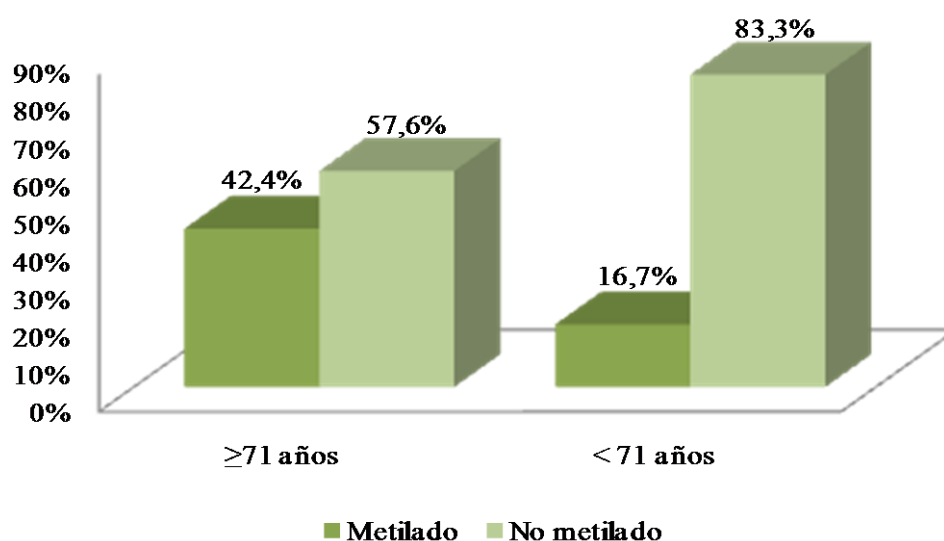


Figura 31: Distribución del porcentaje de la metilación MET2 según la edad de los pacientes con CCR.

Con respecto al estadio tumoral, tampoco se encontró relación significativa. Los tumores en estadios iniciales presentaron metilación en el 34,5% de los casos y el 65,5% no presentó metilación. En los tumores en estadio C se observó un 28,6% de metilación y un 71,4% de ausencia de metilación. En el estadio D, el 37,5% de los tumores presentaron metilación y el 62,5% no presentaba metilación ($p=0,93$).

Se observó relación estadísticamente significativa con la localización del tumor. La metilación MET2 era más frecuente en el colon, en la localización proximal. Los tumores situados en colon proximal presentaron metilación en el 48,3% de los casos, los tumores localizados en colon distal en el 8,3% y en recto en el 20,0% ($p=0,03$) (Figura 32).

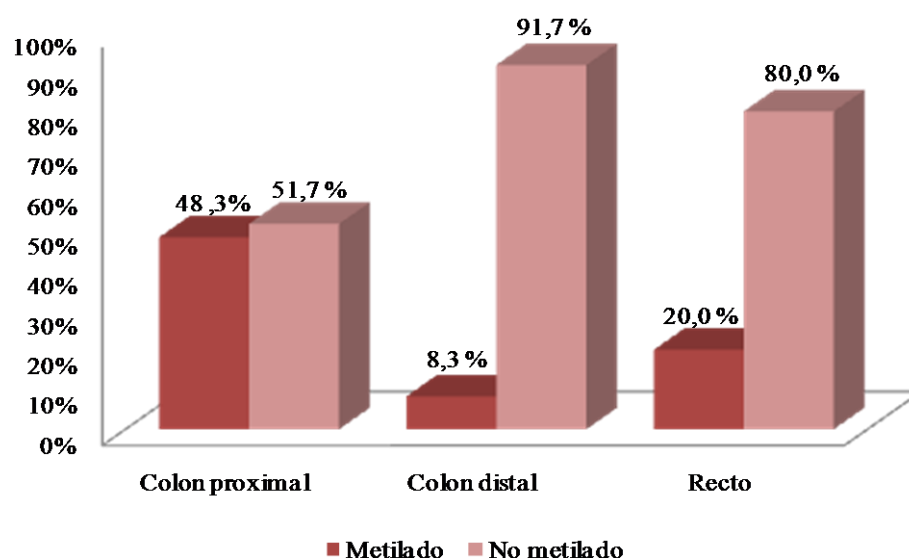


Figura 32: Distribución del porcentaje de la metilación MET2 según la localización de los tumores colorrectales.

No se observó relación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y el estado de metilación. Los adenocarcinomas presentaban metilación en el 36,9% de

los casos y no presentaban metilación en el 63,1%. En los tumores de tipo mucinoso no se observó metilación MET2 en ninguno de los 5 casos ($p=0,15$).

Se observó relación estadísticamente significativa en el estudio de la relación del grado de diferenciación y MET2. La metilación MET2 fue más frecuente en los tumores menos diferenciados. La metilación MET2 fue más frecuente en los tumores menos diferenciados. La metilación en los tumores de grado I fue del 22,6% y la ausencia de metilación del 77,4%. En los tumores de grado II el 50,0% presentaba metilación y el 50,0% no presentaba metilación. Los tumores de grado III presentaban metilación en el 75,0% y ausencia de metilación en el 25,0% ($p=0,01$) (Figura 33).

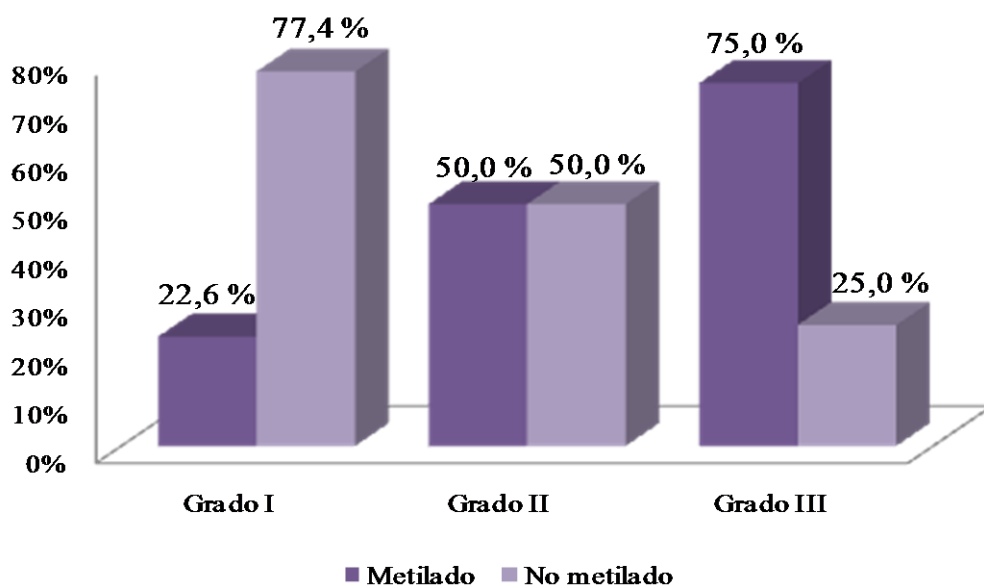


Figura 33: Distribución del porcentaje de la metilación MET2 según el grado de diferenciación de los tumores colorrectales.

Tabla XIX: Prevalencia de la metilación MET2 en relación con las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos en la serie de pacientes con CCR y MSI.

| Variable | n (1) | Metilado | No metilado | p |
|--------------------------------|----------------------------|------------|-------------|-------------|
| Sexo | Hombres: 22 (43,1%) | 5 (22,7%) | 17 (77,3%) | 0,16 |
| | Mujeres: 29 (56,9%) | 12 (41,4%) | 17 (58,6%) | |
| Edad | ≥ 71 años: 33 (64,7%) | 14 (42,4%) | 19 (57,6%) | 0,06 |
| | < 71 años: 18 (35,3%) | 3 (16,7%) | 15 (83,3%) | |
| Dukes | A+B: 29 (56,8%) | 10 (34,5%) | 19 (65,5%) | 0,93 |
| | C: 14 (27,4%) | 4 (28,6%) | 10 (71,4%) | |
| | D: 8 (15,7%) | 3 (37,5%) | 5 (62,5%) | |
| Localización | Colon proximal: 29 (56,8%) | 14 (48,3%) | 15 (51,7%) | 0,03 |
| | Colon distal: 12 (23,5%) | 1 (8,3%) | 11 (91,7%) | |
| | Recto: 10 (19,6%) | 2 (20,0%) | 8 (80,0%) | |
| Tipo histológico | Adenocarcinoma: 46 (90,2%) | 17 (36,9%) | 29 (63,1%) | 0,15 |
| | Mucoide: 5 (9,8%) | 0 (0%) | 5 (100%) | |
| Grado de diferenciación | I: 31 (65,9%) | 7 (22,6%) | 24 (77,4%) | 0,01 |
| | II: 12 (25,5%) | 6 (50,0%) | 6 (50,0%) | |
| | III: 4 (8,5%) | 3 (75,0%) | 1 (25,0%) | |

5. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES GENÉTICAS

Se relacionaron las variables genéticas objeto de este estudio, mutación V600E del gen *BRAF*, metilación del promotor del gen *P16* y la variable MET2 y las variables genéticas estudiadas previamente en la misma población, metilación del promotor del gen *hMLH1* y MSI.

5.1 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* Y LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *P16*

La relación entre la mutación V600E y la metilación de *P16* mostró que la mutación en el gen *BRAF* era significativamente más frecuente en los tumores que presentaban metilación en *P16* (11,1%) que en los tumores que no la presentaban (2,2%) ($p=0,004$) (Tabla XX) (Figura 34).

Tabla XX: Prevalencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en relación con la metilación del promotor de *P16*. Serie de pacientes con CCR.

| | <i>BRAF</i> mutado | <i>BRAF</i> no mutado | p |
|---------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| Metilación <i>P16</i> | 8 (11,1%) | 64 (88,9%) | 0,004 |
| No Metilación <i>P16</i> | 5 (2,2%) | 221 (97,8%) | |

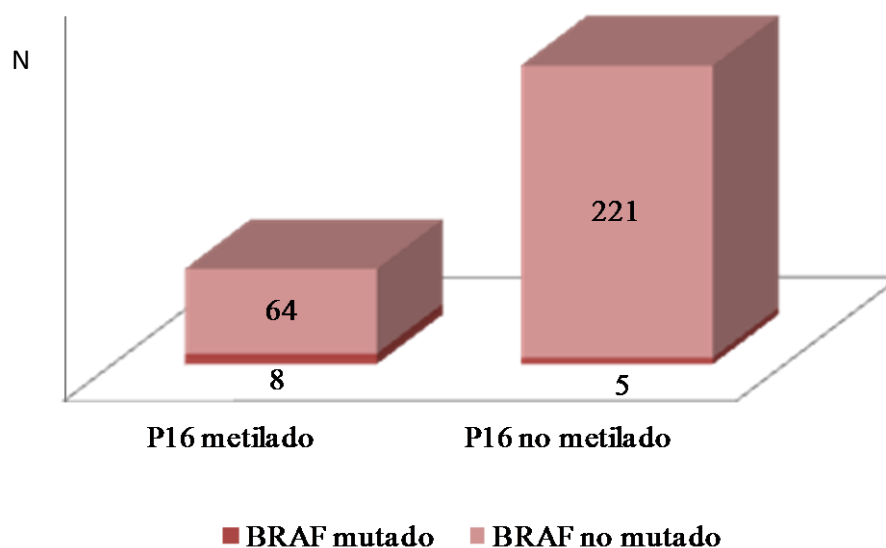


Figura 34: Distribución de la mutación del gen *BRAF* según la metilación del promotor de *P16* en los pacientes con CCR.

5.2 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* Y LA VARIABLE MET2

En la relación entre la mutación V600E y la variable MET2 se observó que la mutación en el gen *BRAF* era significativamente más frecuente en los tumores que presentaban que la metilación MET2 (50,0%) que en los tumores que no la presentaban (13,3%) ($p=0,009$) (Tabla XXI) (Figura 35).

Tabla XXI: Prevalencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en relación con la metilación MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| | <i>BRAF</i> mutado | <i>BRAF</i> no mutado | p |
|---------------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| Metilación MET2 | 7 (50,0%) | 7 (50,0%) | 0,009 |
| No Metilación MET2 | 4 (13,3%) | 26 (86,6%) | |

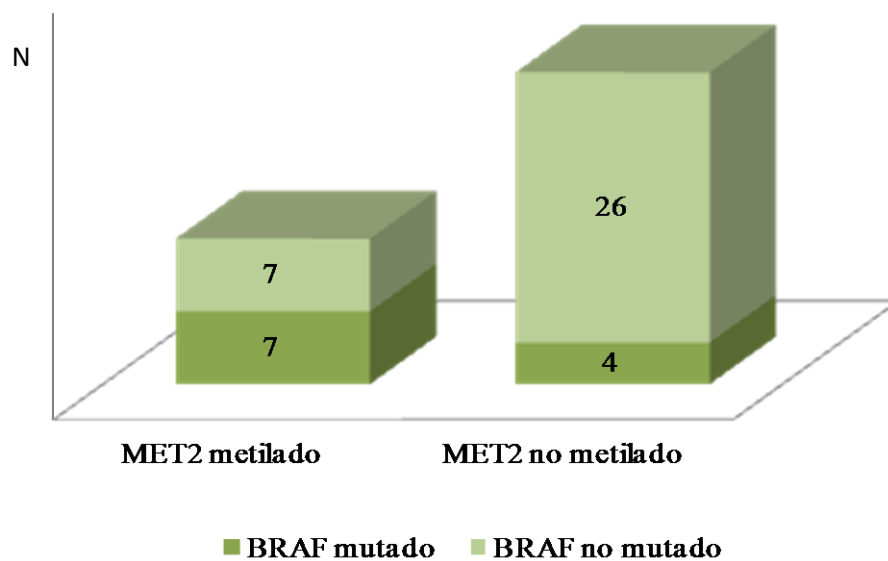


Figura 35: Distribución de la metilación MET2 según la mutación del gen *BRAF* en los pacientes con CCR.

5.3 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* Y LA MSI

La relación entre la mutación V600E y la MSI mostró que la mutación en *BRAF* era significativamente más frecuente en los tumores que presentaron MSI-H (30%) que en los tumores con MSI-L (19,2%) y que en los tumores con MSS (8%) ($p < 0,001$) (Tabla XXII) (Figura 36).

Tabla XXII: Prevalencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en relación con la inestabilidad de microsatélites. Serie de pacientes con CCR.

| | <i>BRAF</i> mutado | <i>BRAF</i> no mutado | p |
|--------------|--------------------|-----------------------|------------------|
| MSS | 2 (0,8%) | 256 (99,2%) | <0,001 |
| MSI-L | 5 (19,2%) | 21 (80,8%) | |
| MSI-H | 6 (30,0%) | 14 (70,0%) | |

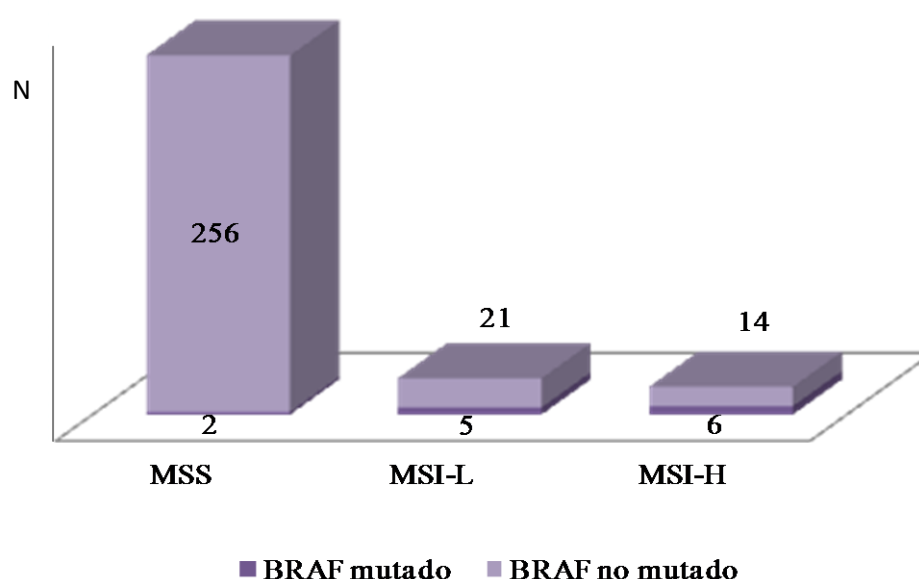


Figura 36: Distribución de la mutación del gen *BRAF* según la inestabilidad de microsatélites en los pacientes con CCR.

5.4 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA MUTACIÓN V600E DEL GEN *BRAF* Y LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *hMLH1*

En la relación entre la mutación V600E y la metilación de *hMLH1* se observó que la mutación en el gen *BRAF* era más frecuente en los tumores con metilación del gen *hMLH1* (35,5%) que en los que no presentaban esta metilación (0%). Todos los tumores con la mutación V600E tenían el gen *hMLH1* metilado ($p=0,004$) (Tabla XXIII) (Figura 37).

Tabla XXIII: Prevalencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en relación con la metilación del promotor de *hMLH1*. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| | <i>BRAF</i> mutado | <i>BRAF</i> no mutado | p |
|--------------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| <i>hMLH1</i> metilado | 11 (35,5%) | 20 (64,5%) | 0,004 |
| <i>hMLH1</i> no metilado | 0 (0%) | 14 (100%) | |

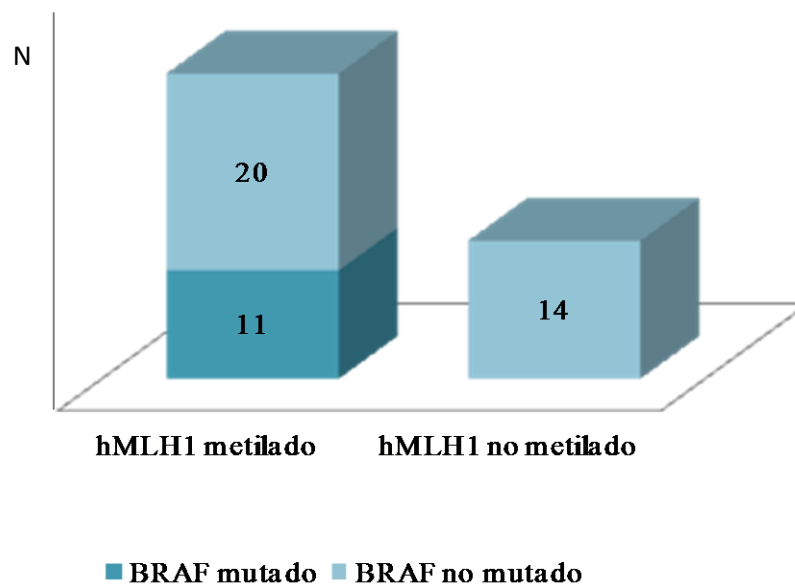


Figura 37: Distribución de la mutación del gen *BRAF* según la metilación del promotor de *hMLH1* en los pacientes con CCR.

5.5 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *P16* Y LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *hMLH1*

La relación entre la metilación de *P16* y la metilación de *hMLH1* no mostró asociación significativa. La metilación del promotor *P16* fue más frecuente en los tumores que presentaban metilación de *hMLH1* (48,6%) que en los tumores que no tenían *hMLH1* metilado (28,6%) ($p=0,19$) (Tabla XXIV).

Tabla XXIV: Prevalencia de la metilación del promotor de *P16* en relación con la metilación del promotor de *hMLH1*. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| | <i>P16</i> metilado | <i>P16</i> no metilado | p |
|--------------------------|---------------------|------------------------|------|
| <i>hMLH1</i> metilado | 18 (48,6%) | 19 (51,4%) | 0,19 |
| <i>hMLH1</i> no metilado | 4 (28,6%) | 10 (71,4%) | |

5.6 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *P16* Y LA MSI

La relación entre la metilación del promotor *P16* y la MSI mostró que la metilación de *P16* fue significativamente más frecuente en los tumores que presentaban MSI-H (42,9%) y MSI-L (44,8%) que en los tumores que presentaban MSS (20,5%) ($p=0,002$) (Tabla XXV) (Figura 38).

Tabla XXV: Prevalencia de la metilación del promotor de *P16* en relación con la inestabilidad de microsatélites. Serie de pacientes con CCR.

| | <i>P16</i> Metilado | <i>P16</i> No metilado | p |
|--------------|---------------------|------------------------|--------------|
| MSS | 54 (20,5%) | 209 (79,5%) | 0,002 |
| MSI-L | 13 (44,8%) | 16 (55,2%) | |
| MSI-H | 9 (42,9%) | 12 (57,1%) | |

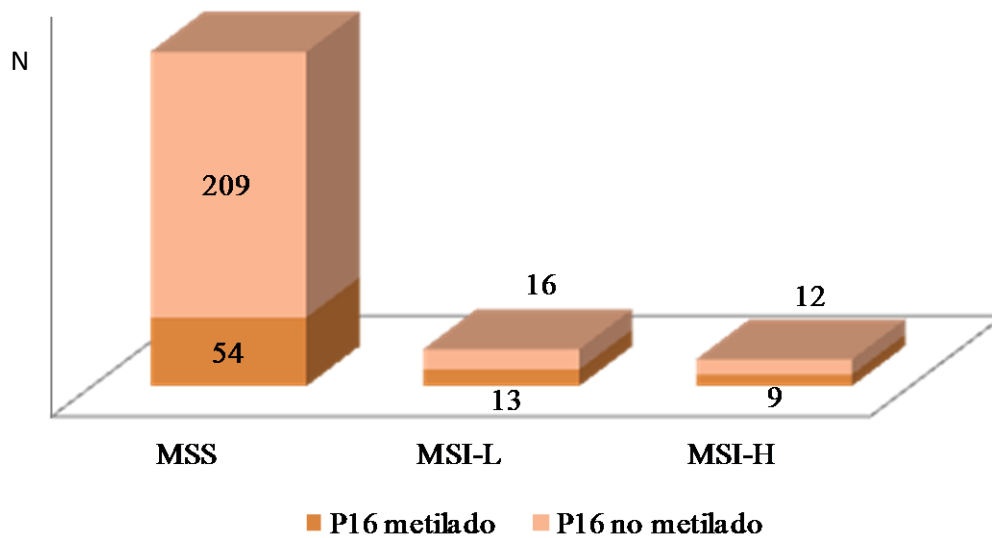


Figura 38: Distribución de la metilación del promotor de *P16* según la inestabilidad de microsatélites en los pacientes con CCR.

5.7 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA VARIABLE MET2 Y LA MSI

La relación entre la variable MET2 y la MSI no mostró asociación significativa.

La metilación MET2 se presentó con frecuencias similares en los tumores con MSI-L y con MSI-H, 32,1% y 38,1% respectivamente ($p=0,66$) (Tabla XXVI).

Tabla XXVI: Prevalencia de MSI en relación con la MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| | Metilación MET2 | No Metilación MET2 | p |
|-------|-----------------|--------------------|------|
| MSI-L | 9 (32,1%) | 19 (63,9%) | 0,66 |
| MSI-H | 8 (38,1%) | 13 (61,9%) | |

6. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL

6.1. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

En el estudio de la SG sólo se consideraron como eventos los pacientes que fallecieron como consecuencia del tumor. En el momento de realizar este análisis habían fallecido 183 pacientes como consecuencia de su patología tumoral (56,1%) y 36 pacientes debido a otras causas (11,0%).

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 92 meses (rango intercuartílico $P_{25}=75$ meses y $P_{75}=111$ meses). Todos los análisis de la SG quedan referidos a la mediana del tiempo de seguimiento.

La SG acumulada de los pacientes a los 92 meses fue del 63,8% (Figura 39).

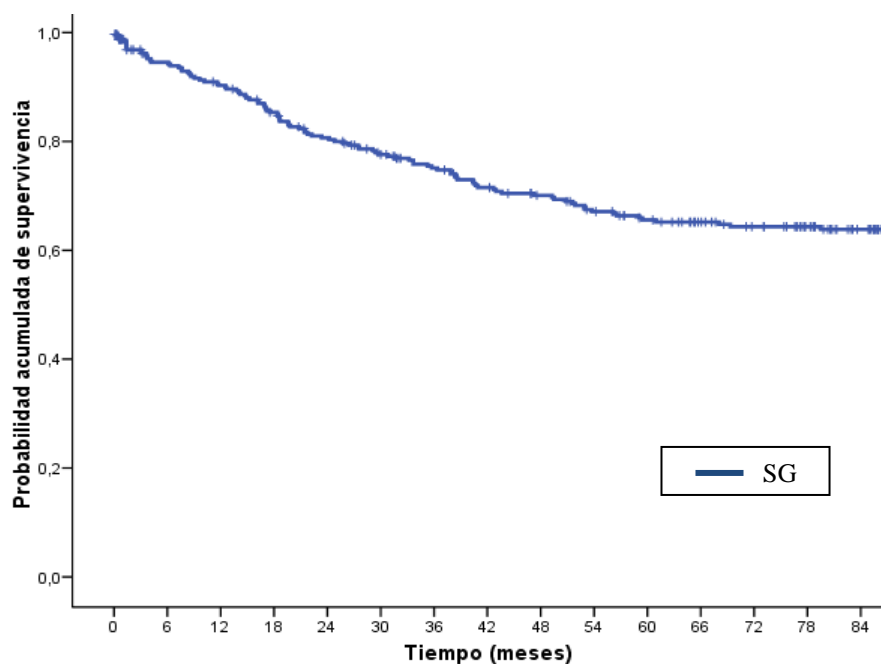


Figura 39: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR.

6.2. ANÁLISIS UNIVARIABLE DE LA PROBABILIDAD ACUMULADA DE FALLECER DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

Se estudió la relación de las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos con la SG de los pacientes con CCR.

En la tabla XXVII se muestra la SG de los pacientes con respecto a las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos estudiados, así como el riesgo de fallecer que presentaban.

El sexo y la localización tumoral no presentaron significación pronóstica respecto a la SG.

De los factores pronóstico clásicos, sólo el estadio tumoral mostró asociación estadísticamente significativa con la SG. La HR (*Hazard Ratio* o razón de riesgos) de fallecer de los pacientes en estadio D fue 24,7 veces mayor que en los pacientes en estadios A o B ($p < 0,001$) (Figura 40).

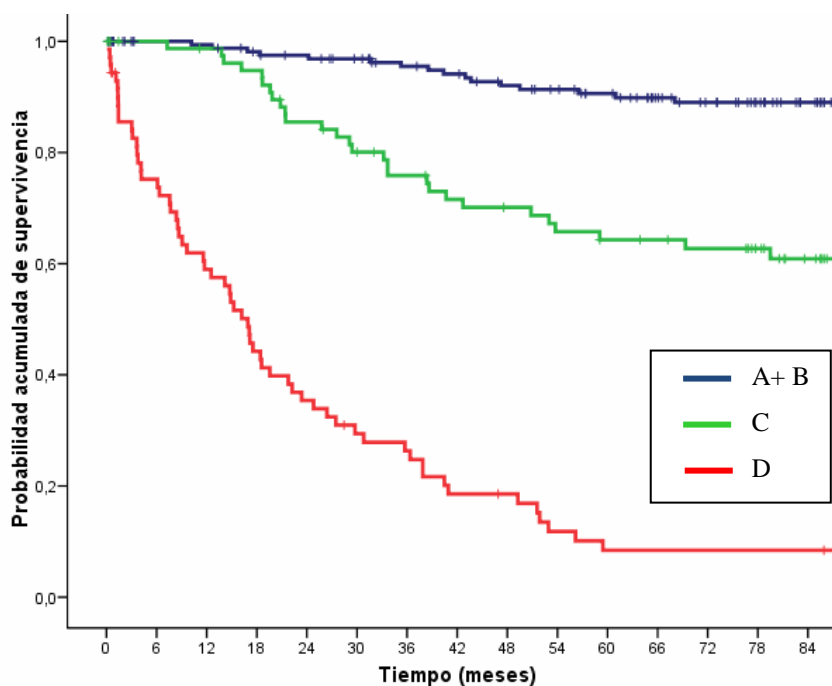


Figura 40: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según el estadio de Dukes.

La edad, el tipo histológico y el grado mostraron asociación clínica con la SG. La HR de fallecer del grupo de pacientes de mayor edad fue 1,4 veces mayor que la de los pacientes menores de 71 años ($p=0,06$) (Figura 41). La SG de los pacientes con

adenocarcinomas fue del 65,3% mientras que en aquellos que presentaban tumores de tipo mucoide fue de 44,1% (HR=0,57) (p=0,07) (Figura 42). La SG de los pacientes que presentaban tumores grado I fue del 66,0% mientras que en aquellos que presentaban tumores de grado II fue del 56,0% (HR=1,59) y en los de grado III del 43,0% (HR=1,86) (p=0,08) (Figura 43).

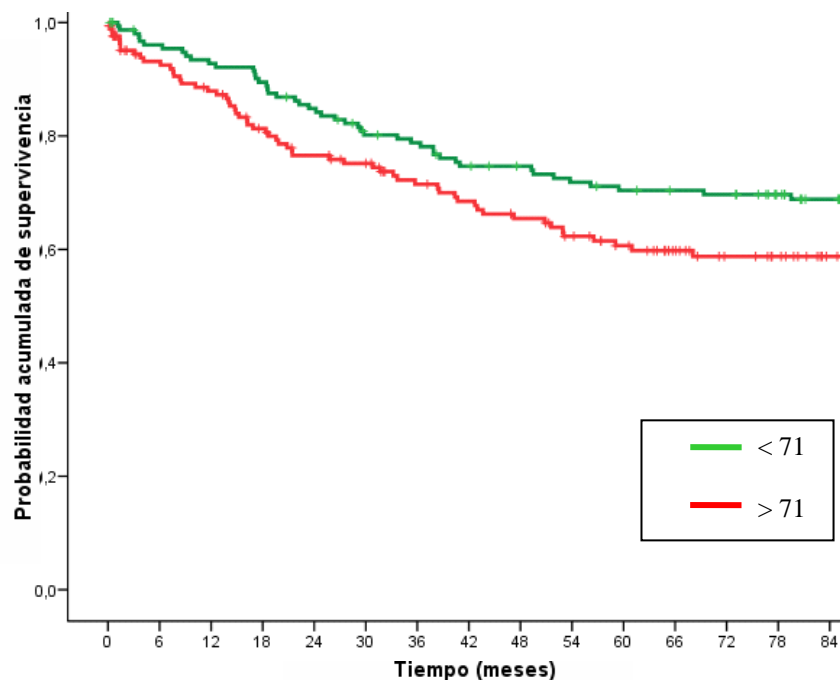


Figura 41: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según la edad.

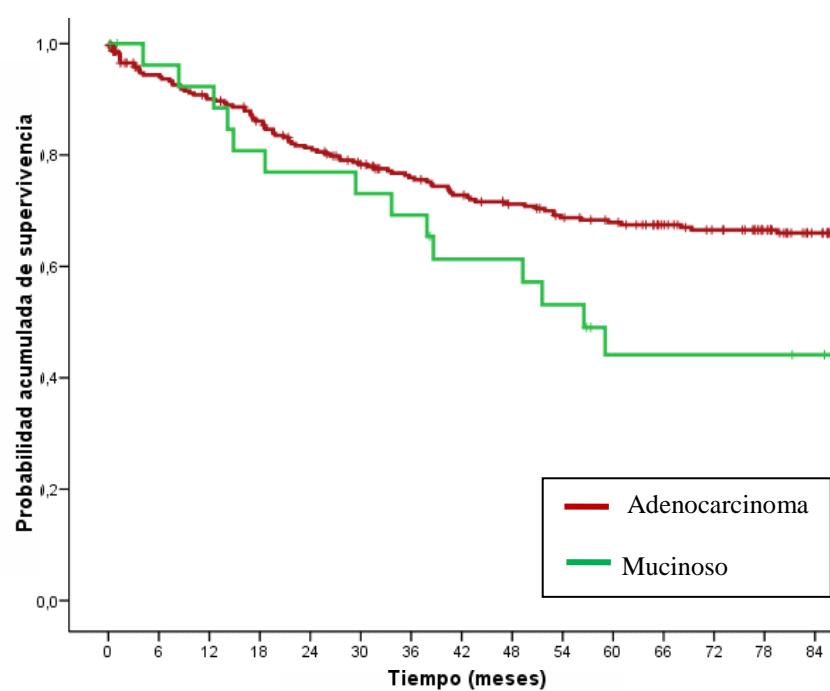


Figura 42: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según el tipo histológico.

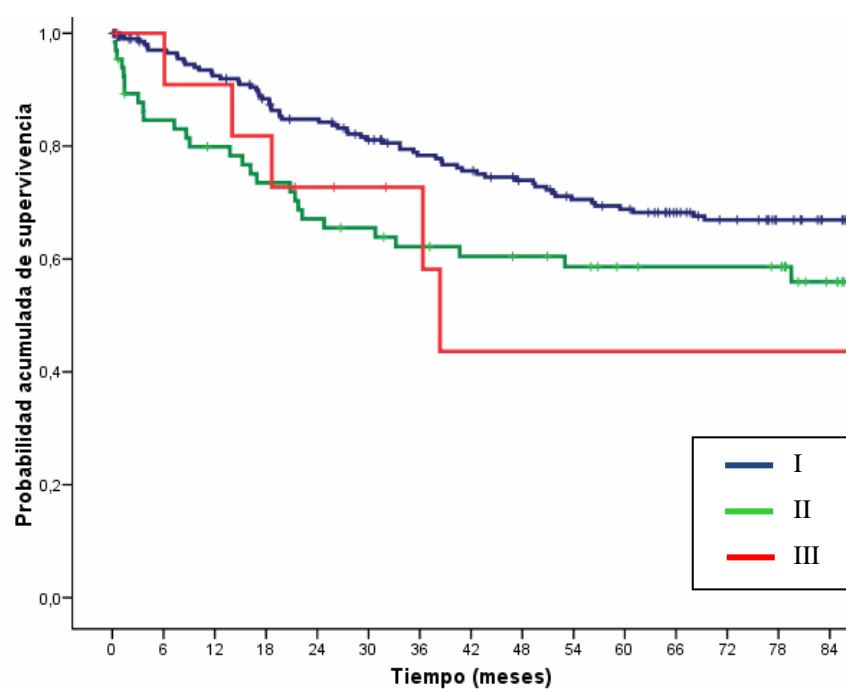


Figura 43: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según el grado de diferenciación tumoral.

Tabla XXVII: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con las variables clínico-patológicas en la serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | SG (92m) | HR* | IC 95% | p |
|-------------------------------|----------------|----------|------|-----------|--------|
| Sexo | Hombres | 59,5% | 1,3 | 0,9-1,9 | 0,12 |
| | Mujeres | 67,2% | | | |
| Edad | ≥ 71 años | 58,8% | 1,4 | 0,9-2,0 | 0,06 |
| | < 71 años | 67,7% | | | |
| Dukes | A+B | 89,0% | | | <0,001 |
| | C | 60,9% | 4,2 | 2,3-7,8 | |
| | D | 6,3% | 24,7 | 14,0-43,3 | |
| Localización del tumor | Proximal | 57,7% | 1,6 | 1,0-2,5 | 0,12 |
| | Distal | 62,3% | 1,3 | 0,8-2,1 | |
| | Recto | 68,6% | | | |
| Tipo Histológico | Adenocarcinoma | 65,3% | 0,57 | 0,3-0,1 | 0,07 |
| | Mucoide | 44,1% | | | |
| Grado | I | 66,0% | | | 0,08 |
| | II | 56,0% | 1,59 | 1,0-2,5 | |
| | III | 43,0% | 1,86 | 0,7-4,6 | |

IC95%: intervalo de confianza 95%. Significación estadística: $p < 0,05$. * Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

6.3. ANÁLISIS UNIVARIABLE DE LA PROBABILIDAD ACUMULADA DE FALLECER DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL EN RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES GENÉTICAS ESTUDIADAS

6.3.1 Mutación V600E del gen *BRAF*

Se estudió si la mutación V600E presentaba relación con la SG de los pacientes con CCR.

El estudio de la mutación del gen *BRAF* no mostró diferencias en la SG de los pacientes (Figura 44). En el grupo de pacientes que presentaba la mutación la SG fue del 61,5%, mientras que en los pacientes con la mutación fue del 62,4% ($p=0,9$) (Tabla XXVIII).

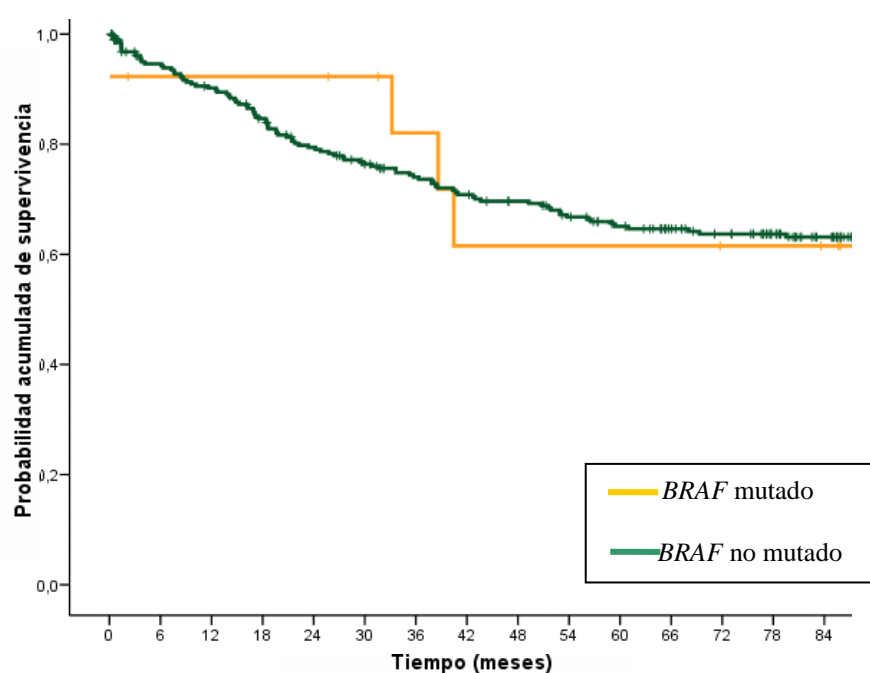


Figura 44: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de la mutación V600E.

Tabla XXVIII: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con la mutación V600E. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | SG (92 m) | HR* | IC 95% | p |
|-------------|------------|-----------|------|-----------|-----|
| <i>BRAF</i> | Mutado | 61,5% | 0,94 | 0,34-2,56 | 0,9 |
| | No mutado | 62,4% | | | |

* Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

6.3.2 Metilación del gen *P16*

Se estudió si la metilación de la región promotora del gen *P16* confiere diferencias en el riesgo de fallecer de los pacientes con CCR.

El análisis de la metilación de *P16* no determinó diferencias en la SG de los pacientes (Figura 45). Los pacientes con *P16* metilado mostraron una SG del 62,6% y los que no tenían metilación en *P16* del 64,0% ($p=0,69$) (Tabla XXIX).

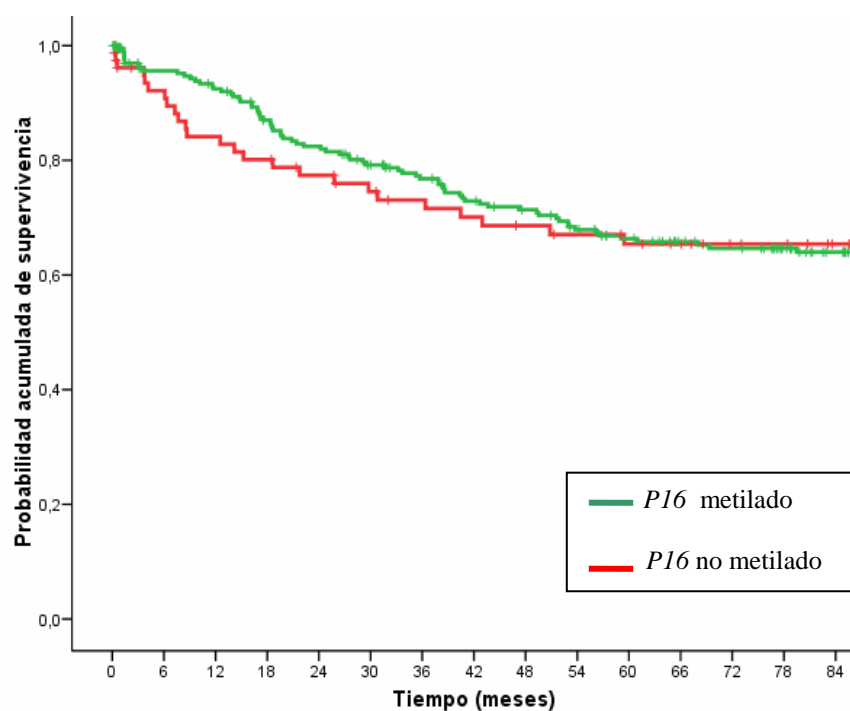


Figura 45: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de metilación del promotor de *P16*.

Tabla XXIX: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con la metilación de *P16*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | SG (92 m) | HR* | IC 95% | p |
|------------|--------------------|-----------|------|---------|------|
| <i>P16</i> | Metilado | 62,6% | 1,09 | 0,7-1,7 | 0,69 |
| | No metilado | 64,0% | | | |

* Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

6.3.3 Metilación MET2

Se evaluó si en el subgrupo de pacientes en el que se analizó la metilación MET2 confiere diferencias en el riesgo de fallecer de estos pacientes.

El análisis de la variable no mostró diferencias en la SG de los pacientes con metilación MET2 (Figura 46). Los pacientes con metilación presentaron una SG del 85,6% mientras que la SG era del 76,6% cuando el promotor no se encontraba metilado ($p=0,61$) (Tabla XXX).

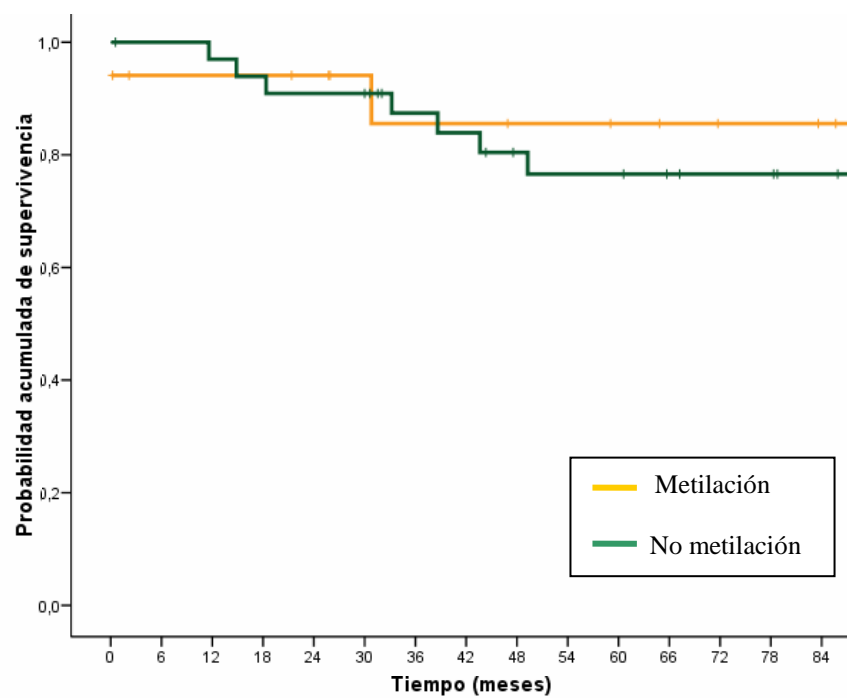


Figura 46: Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de metilación MET2.

Tabla XXX: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con la metilación MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| Variable | Categorías | SG (92 m) | HR* | IC 95% | p |
|----------|-------------|-----------|-------|----------|------|
| MET2 | Metilado | 85,6% | 0,607 | 0,13-3,2 | 0,61 |
| | No metilado | 76,6% | | | |

* Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

6.4. ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL ENTRE LOS FACTORES PRONÓSTICO Y LAS VARIABLES GENÉTICAS

6.4.1 Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y la mutación V600E del gen *BRAF*

Se ha estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la determinación de la mutación V600E del gen *BRAF*. Este análisis estratificado se muestra en la tabla XXXI.

Con respecto al sexo de los pacientes no se observaron diferencias significativas en la SG debidas a esta alteración genética. En los hombres con el gen *BRAF* mutado la SG a los 92 meses era del 26,7%, mientras que en los que no tenían la mutación fue del 59,7% ($p=0,17$). En las mujeres la SG era del 83,3% en aquellas que tenían la mutación y del 65,5% en las que no la tenían ($p=0,28$).

En el análisis estratificado con respecto a la edad, en los pacientes con edad mayor o igual de 71 años se observó una SG a los 92 meses del 65,6% en tumores con la mutación en *BRAF* y del 57,2% en los que no la tenían ($p=0,81$). En el grupo de pacientes con edad inferior a los 71 años, la SG a los 92 meses fue del 60,0% en los tumores mutados y del 67,7% en los no mutados ($p=0,97$).

En el análisis estratificado respecto al estadio de Dukes, los pacientes con tumores en estadio A o B presentaron una SG a los 92 meses del 100% en tumores con la mutación en *BRAF* y del 89,4% en tumores sin la mutación ($p=0,52$). La SG de los pacientes en estadio C fue del 50,0% en tumores mutados y del 59,4% en los no mutados ($p=0,87$). En los pacientes con tumores en estadio D se observó una SG del 33,3% en tumores con la mutación y del 5,5% en los que no la tenían ($p=0,16$) (Figura 47).

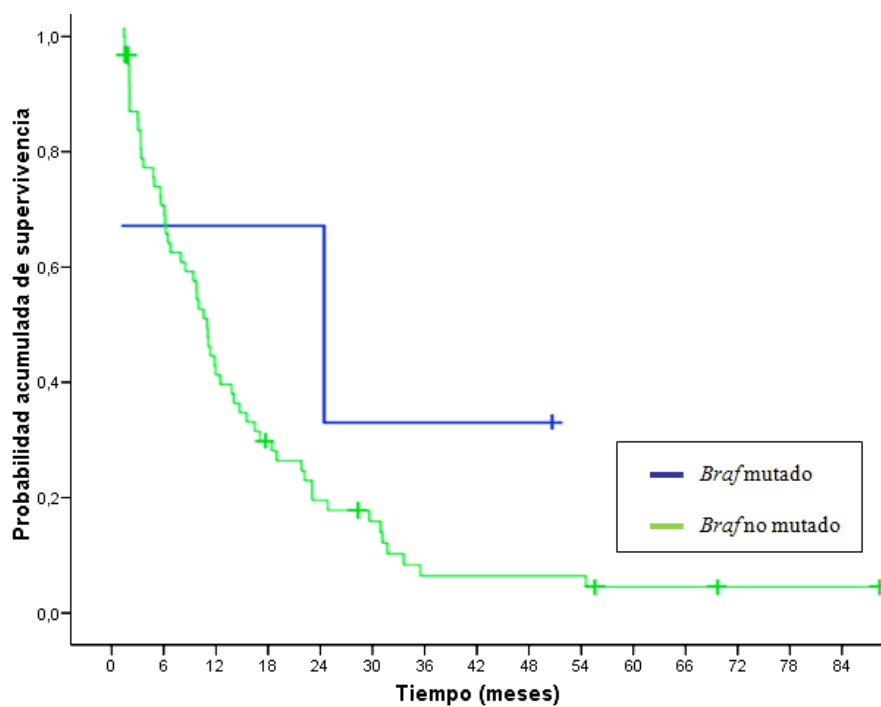


Figura 47: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de la mutación V600E del gen BRAF en tumores colorrectales en estadio D.

En el análisis estratificado de la localización tumoral se observó que los tumores de colon con localización distal la mutación V600E marcaba diferencias en la SG. La SG de los pacientes a los 92 meses era del 0% en aquellos con tumores que tenían la mutación y del 61,3% en los que no la tenían ($p < 0,001$) (Figura 48). En los tumores de colon de localización proximal no se observó que la mutación del gen *BRAF* estableciese diferencias en la SG, observándose una SG a los 92 meses del 66,7% en tumores con la mutación y del 55,2% en los que no la tenían ($p = 0,16$). En el caso de los tumores de recto hay que destacar que ninguno tuvo el gen *BRAF* mutado.

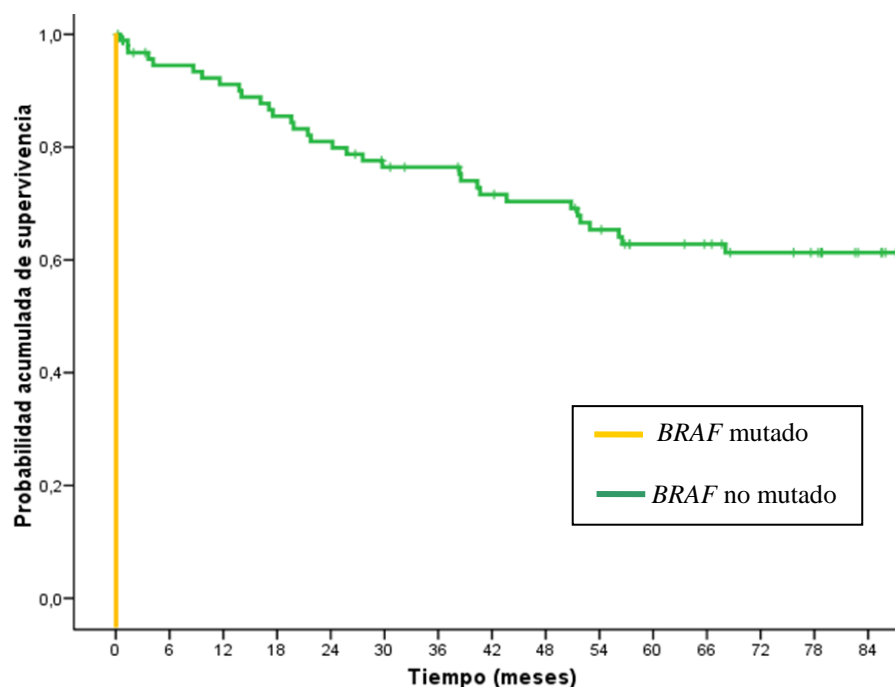


Figura 48: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en tumores colorrectales con localización distal.

En el análisis estratificado con respecto al tipo histológico, los adenocarcinomas con *BRAF* mutado presentaron una SG del 64,9% y del 64,6% en los tumores sin la mutación ($p=0,89$). En los tumores de tipo histológico mucinoso la SG fue del 50,0% en los mutados y del 39,8% en los no mutados ($p=0,66$).

Al estudiar el grado de diferenciación, observamos que los pacientes con tumores de grado I tenían una SG del 50,0% en tumores donde se observaba la mutación V600E y del 66,2% en los que no estaba presente la mutación ($p=0,82$). En los pacientes con tumores de grado II se observó una SG del 50,0% en tumores mutados y del 53,4% en los no mutados ($p=0,77$). La SG de los pacientes con tumores grado III fue del 100% en aquellos que tenían *BRAF* mutado y del 33,3% en los no mutados ($p=0,36$).

Tabla XXXI: Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio de la mutación del gen *BRAF* en la serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | <i>BRAF</i> | SG (92 meses) | p |
|--------------------------------|----------------|---------------------|----------------|------------------|
| Sexo | Hombre | Mutado No mutado | 26,7% 59,7% | 0,17 |
| | Mujer | Mutado No mutado | 83,3% 65,5% | 0,28 |
| Edad | ≥ 71 años | Mutado No mutado | 65,6% 57,2% | 0,81 |
| | < 71 años | Mutado No mutado | 60,0% 67,7% | 0,97 |
| Dukes | A+B | Mutado No mutado | 100% 89,4% | 0,52 |
| | C | Mutado No mutado | 50,0% 59,4% | 0,87 |
| | D | Mutado No mutado | 33,3% 5,5% | 0,65 |
| Localización | Colon proximal | Mutado No mutado | 66,7% 55,2% | 0,16 |
| | Colon Distal | Mutado No mutado | 0% 61,3% | <0,001 |
| | Recto | Mutado No mutado | --- 68,9% | |
| Histología | Adenocarcinoma | Mutado No mutado | 64,9% 64,6% | 0,89 |
| | Mucinoso | Mutado No mutado | 50,0% 39,8% | 0,66 |
| Grado de diferenciación | I | Mutado No mutado | 50,0% 66,2% | 0,82 |
| | II | Mutado No mutado | 50,0% 53,4% | 0,77 |
| | III | Mutado No mutado | 100% 33,3% | 0,36 |

6.4.2 Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y la metilación del promotor del gen *P16*

Se ha estudiado la SG de los pacientes mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el estado de metilación de la región promotora del gen *P16*. Este análisis estratificado se muestra en la tabla XXXII.

Cuando se estratificó por el sexo de los pacientes, se observó que en los hombres la metilación de *P16* marcaba diferencia estadísticamente significativa en la SG a los 92 meses. En los varones que presentaban metilación en la región promotora del gen la supervivencia era del 50,2% y en ausencia de metilación la SG fue del 63,6% ($p=0,04$) (Figura 49). En las mujeres se observó una SG del 78,1% cuando existía metilación y del 64,3% en ausencia de metilación ($p=0,23$).

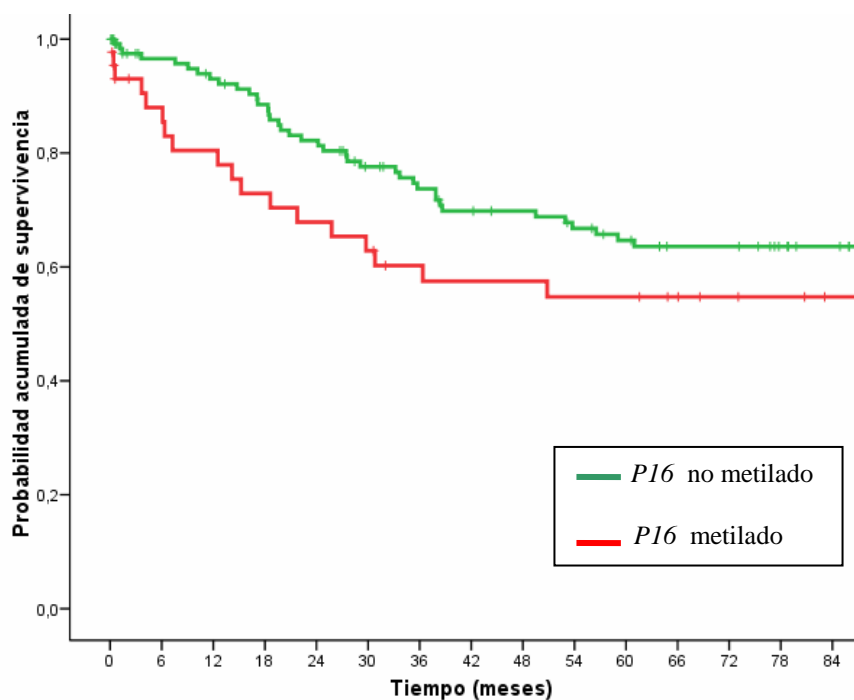


Figura 49: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de metilación del promotor del gen *P16* en varones con CCR.

Con respecto a la edad de los pacientes, en aquellos con 71 años o más la SG fue del 67,7% con metilación y del 56,2% sin metilación ($p=0,85$). En el grupo de edad menor de 71 años la SG fue del 57,0% cuando la metilación del gen estaba presente y del 70,5% cuando no existía metilación ($p=0,24$).

En el análisis estratificado con respecto al estadio de Dukes, los pacientes con tumores en estadio A o B presentaron una SG del 96,9% en aquellos con metilación y del 86,5% sin metilación ($p=0,10$). La SG de los pacientes en estadio C fue del 75,5% en el caso de tumores metilados y del 58,3% en los que no mostraban metilación ($p=0,45$). En los pacientes con tumores en estadio D se observó una SG del 6,9% en aquellos que presentaban metilación y del 9,8% en aquellos que no presentaban metilación ($p=0,26$).

En el análisis estratificado respecto a la localización tumoral, se observó que en los tumores de colon con localización proximal la SG de los pacientes fue del 62,3% y del 56,7% en aquellos con la región promotora metilada y en ausencia de metilación, respectivamente ($p=0,57$). Los pacientes con tumores de colon con localización distal presentaron una supervivencia del 55,6% cuando presentaban metilación y del 64,6% cuando no había metilación ($p=0,25$). En el caso de los pacientes con tumores localizados en recto, la SG fue del 69,6% con metilación y del 69,3% en ausencia de metilación ($p=0,72$).

Respecto al tipo histológico se observó que en los adenocarcinomas la SG fue del 64,9% en los pacientes que presentaban metilación de *P16* y del 65,9% en los que no presentaban metilación ($p=0,76$). En el caso de los tumores mucinosos la SG de los pacientes fue del 40,0% y del 43,7% en aquellos con la región promotora metilada y en ausencia de metilación, respectivamente ($p=0,22$).

Al estudiar el grado de diferenciación, observamos que en los pacientes con tumores de grado II la metilación de *P16* marcaba diferencias en la SG. Los pacientes con tumores de grado II tenían una SG del 43,8% en el caso de existir metilación y del 59,2% cuando no existía metilación ($p=0,06$) (Figura 50). En los casos de tumores con grado I o grado III de diferenciación la metilación no marcó diferencias en la SG. En los tumores de grado I la SG de los pacientes fue del 71,5% y del 64,8% en aquellos con la región promotora metilada y en ausencia de metilación, respectivamente ($p=0,44$). En los pacientes con tumores grado III se observó una SG del 57,1% en aquellos con

metilación del gen, mientras que en los que no presentaban metilación la SG fue del 25,0% ($p=0,37$).

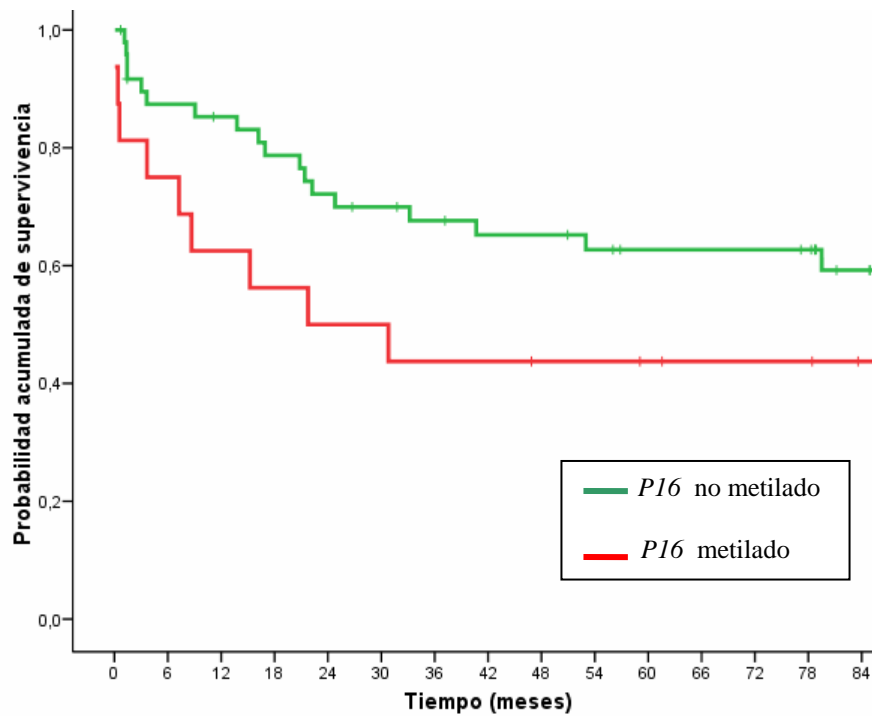


Figura 50: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de metilación del promotor del gen *P16* en tumores de colorrectales de grado II.

Tabla XXXII: Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y la metilación del promotor del gen *P16* en la serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | <i>P16</i> | SG (92 meses) | p |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------|
| Sexo | Hombre | Metilado No metilado | 50,2% 63,6% | 0,04 |
| | Mujer | Metilado No metilado | 78,1% 64,3% | 0,23 |
| Edad | ≥ 71 años | Metilado No metilado | 67,7% 56,2% | 0,85 |
| | < 71 años | Metilado No metilado | 57,0% 70,5% | 0,24 |
| Dukes | A+B | Metilado No metilado | 96,9% 86,5% | 0,1 |
| | C | Metilado No metilado | 75,5% 58,3% | 0,45 |
| | D | Metilado No metilado | 6,9% 9,8% | 0,26 |
| Localización | Colon proximal | Metilado No metilado | 62,3% 56,7% | 0,57 |
| | Colon Distal | Metilado No metilado | 55,6% 64,6% | 0,25 |
| | Recto | Metilado No metilado | 69,6% 69,3% | 0,72 |
| Histología | Adenocarcinoma | Metilado No metilado | 64,9% 65,9% | 0,76 |
| | Mucinoso | Metilado No metilado | 40,0% 43,7% | 0,22 |
| Grado de diferenciación | Grado I | Metilado No metilado | 71,5% 64,8% | 0,44 |
| | Grado II | Metilado No metilado | 43,8% 59,2% | 0,06 |
| | Grado III | Metilado No metilado | 57,1% 25,0% | 0,37 |

6.4.3 Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y la metilación MET2

Se ha estudiado la SG de los pacientes con tumores que presentaban MSI mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el valor de la determinación de la variable MET2 que agrupa la metilación de la región promotora del gen *hMLH1* y la metilación del promotor del gen *P16*. Este análisis estratificado se muestra en la tabla XXXIII.

Cuando se estratificó por el sexo de los pacientes, se observó que en los hombres la metilación MET2 marcaba diferencias en la SG a los 92 meses. En los varones que presentaban metilación la supervivencia era del 40,0% y en ausencia de metilación la SG fue del 72,9% ($p=0,08$) (Figura 51). En las mujeres se observó una SG del 100% cuando existía metilación y del 80,0% en ausencia de metilación ($p=0,16$).

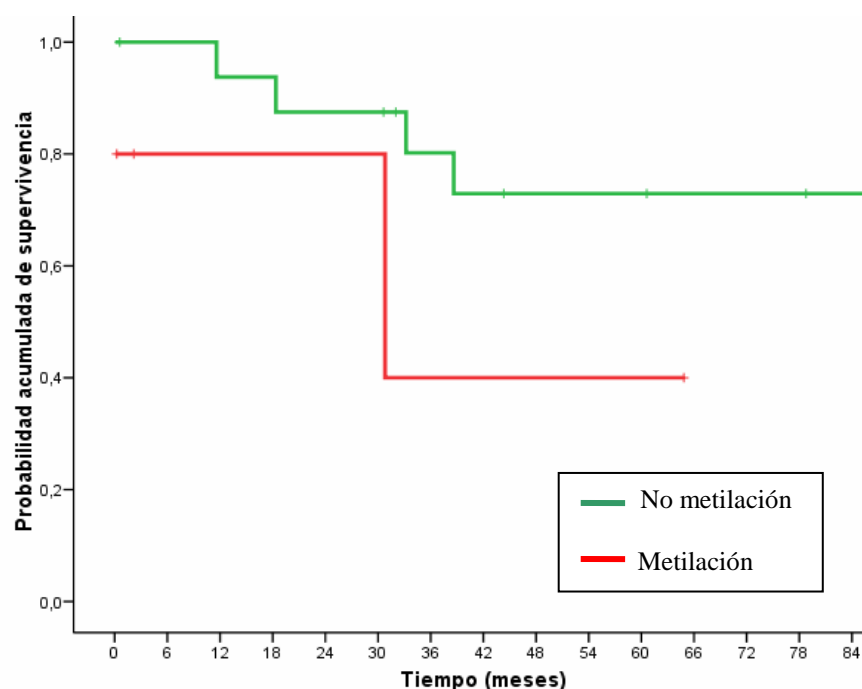


Figura 51: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de metilación MET2 en varones con CCR.

Con respecto a la edad de los pacientes, en aquellos con 71 años o mayores la SG fue del 82,5% con metilación y del 70,2% sin metilación ($p=0,58$). En el grupo de edad menor de 71 años la SG fue del 100% con metilación y del 84,4% cuando no existía metilación ($p=0,57$).

En el análisis estratificado con respecto al estadio de Dukes, los pacientes con tumores en estadio A o B presentaron una SG del 100% en aquellos con metilación y del 80,1% sin metilación ($p=0,36$). La SG de los pacientes en estadio C fue del 100% en el caso de tumores metilados y del 75,0% en los que no mostraban metilación ($p=0,37$). En los pacientes con tumores en estadio D se observó una SG del 33,0% en aquellos que presentaban metilación y del 40,0% en aquellos que no presentaban metilación ($p=0,52$).

En el análisis estratificado de la localización tumoral se observó que los tumores de colon con localización distal, la metilación MET2 marcaba diferencias en la SG. La SG de los pacientes a los 92 meses era del 0% en aquellos tumores con metilación MET2 y del 80,0% en los que no tenían metilación ($p=0,01$) (Figura 52). En los tumores de colon de localización proximal no se observó que MET2 estableciese diferencias en la SG, observándose una SG a los 92 meses del 90,0% en tumores con metilación y del 60,0% en los que no la tenían ($p=0,14$). En el caso de los pacientes con tumores localizados en recto, la SG fue del 100% en todos los pacientes, independientemente del estado de metilación MET2.

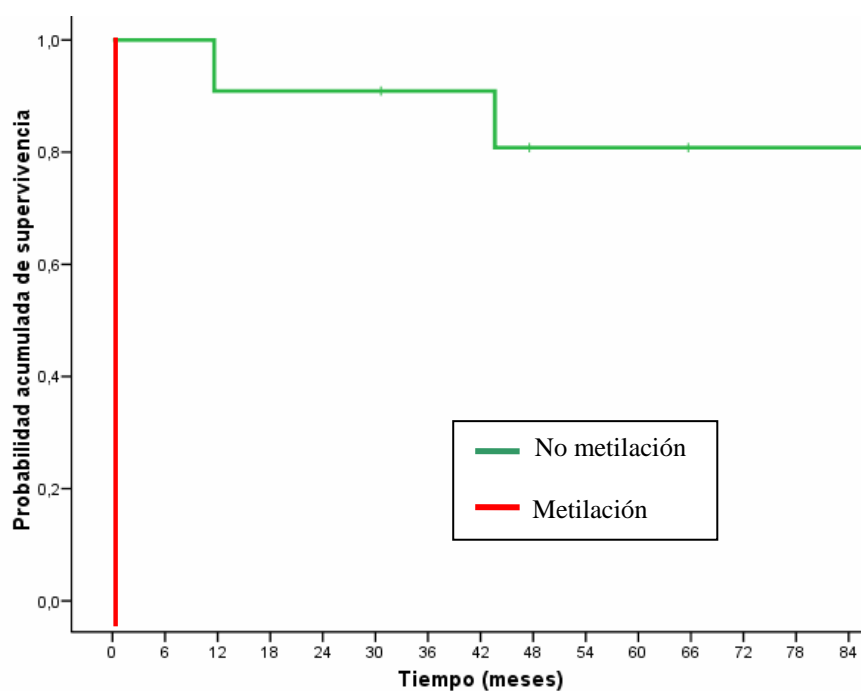


Figura 52: Curva de supervivencia global acumulada según la presencia de metilación MET2 en tumores colorrectales de localización distal.

Respecto al tipo histológico se observó que en los adenocarcinomas la SG fue del 85,6% en los pacientes que presentaban metilación y del 84,4% en los que no

presentaban metilación ($p=0,91$). En el caso de los tumores mucinosos hay que destacar que ninguno presentaba metilación MET2.

Al estudiar el grado de diferenciación, observamos que los pacientes con tumores de grado I tenían una SG del 100% en el caso de existir metilación y del 70,8% cuando no existía metilación ($p=0,24$). En los pacientes con tumores grado II se observó una SG del 66,7% en aquellos con metilación, mientras que en los que no presentaban metilación la SG fue del 83,3% ($p=0,39$). Todos los pacientes con tumores de grado III presentaron una SG del 100%.

Tabla XXXIII: Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y la metilación del promotor de MET2 en la serie de pacientes con CCR y MSI.

| Variable | Categorías | MET2 | SG (92 meses) | p |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------|
| Sexo | Hombre | Metilado No metilado | 40,0% 72,9% | 0,08 |
| | Mujer | Metilado No metilado | 100% 80,0% | 0,16 |
| Edad | ≥ 71 años | Metilado No metilado | 82,5% 70,2% | 0,58 |
| | < 71 años | Metilado No metilado | 100% 84,4% | 0,57 |
| Dukes | A+B | Metilado No metilado | 100% 80,1% | 0,36 |
| | C | Metilado No metilado | 100% 75,0% | 0,37 |
| | D | Metilado No metilado | 33,0% 40,0% | 0,52 |
| Localización | Colon proximal | Metilado No metilado | 90,0% 60,0% | 0,14 |
| | Colon Distal | Metilado No metilado | 0% 80,0% | 0,01 |
| | Recto | Metilado No metilado | 100% 100% | -- |
| Histología | Adenocarcinoma | Metilado No metilado | 85,6% 84,4% | 0,91 |
| | Mucinoso | Metilado No metilado | -- 40,0% | -- |
| Grado de diferenciación | Grado I | Metilado No metilado | 100% 70,8% | 0,24 |
| | Grado II | Metilado No metilado | 66,7% 83,3% | 0,39 |
| | Grado III | Metilado No metilado | 100% 100% | -- |

6.5 ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL ENTRE LAS VARIABLES GENÉTICAS

Se ha estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables genéticas analizadas en este trabajo y determinaciones realizadas anteriormente por nuestro grupo de trabajo; MSI y metilación del gen *hMLH1*.

6.5.1 Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas y la mutación V600E del gen *BRAF*

Se ha estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables genéticas metilación de *P16*, MSI y metilación del promotor de *hMLH1*, y la mutación del gen *BRAF* (Tabla XXXIV).

En el análisis estratificado con respecto a la metilación de *P16*, en los pacientes con metilación en el promotor la SG a los 92 meses fue del 70,0% en aquellos que presentaban la mutación V600E y de 57,4% en los que no la presentaban ($p=0,72$) En los pacientes sin metilación en *P16* la supervivencia fue del 50,0% en aquellos con la mutación de *BRAF* y del 64,4% en los que no la tenían ($p=0,96$).

Con respecto a la MSI se observó que en los pacientes con MSS y *BRAF* mutado la SG a los 92 meses era del 50,0% y en los no mutados de 60,3% ($p=0,97$). En los pacientes con tumores MSI-L se observó una SG del 53,3% cuando estaba presente la

mutación V600E y del 72,6% cuando no lo estaba ($p=0,41$) La SG de los pacientes con MSI-H fue del 75,0% en los tumores con *BRAF* mutado y del 83,1% en los tumores sin la mutación ($p=0,79$).

En el análisis estratificado con respecto a la metilación de *hMLH1*, en los pacientes con metilación en *hMLH1* la SG fue del 61,5% cuando se observaba la mutación V600E y del 76,6% cuando no se observaba ($p=0,63$). En el caso de los tumores sin metilación en *hMLH1* hay que destacar ninguno tenía la mutación V600E.

Tabla XXXIV: Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas y la mutación V600E del gen *BRAF*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | <i>BRAF</i> | SG (92 meses) | P |
|--------------|-------------|-------------|---------------|------|
| <i>P16</i> | Metilado | Mutado | 70,0% | 0,72 |
| | | No mutado | 57,4% | |
| | No metilado | Mutado | 50,0% | 0,96 |
| | | No mutado | 64,4% | |
| MSI | MSS | Mutado | 50,0% | 0,97 |
| | | No mutado | 60,3% | |
| | MSI-L | Mutado | 53,3% | 0,41 |
| | | No mutado | 72,6% | |
| | MSI-H | Mutado | 75,0% | 0,79 |
| | | No mutado | 83,1% | |
| <i>hMLH1</i> | Metilado | Mutado | 61,5% | 0,63 |
| | | No mutado | 76,6% | |
| | No metilado | Mutado | ----- | |
| | | No mutado | 83,6% | |

6.5.2 Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas y la metilación del promotor del gen *P16*.

Se ha estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables genéticas MSI y metilación del promotor de *hMLH1* y la metilación de *P16* (Tabla XXXV).

En el análisis estratificado con respecto a la MSI, observamos que los pacientes con tumores MSS tenían una SG del 53,6% en el caso de existir metilación en *P16* y del 62,5% cuando no existía metilación ($p=0,11$). En los pacientes con tumores MSI-L se observó una SG del 71,2% en aquellos con metilación, mientras que en los que no presentaban metilación la SG fue del 74,0% ($p=0,76$). En el grupo de pacientes MSI-H la SG fue del 100% en aquellos con metilación y del 70,7% sin metilación ($p=0,15$).

Respecto a la metilación del gen *hMLH1* se observó que en los metilados para este gen la SG fue del 78,7% cuando también estaba metilado el gen *P16* y del 100% cuando no lo estaba ($p=0,43$). En el caso de los tumores sin metilación en *hMLH1* la SG fue del 71,7% y del 78,8% en presencia de metilación y en ausencia de metilación de *P16*, respectivamente ($p=0,76$).

Tabla XXXV: Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas y la metilación del promotor del gen *P16*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | <i>P16</i> | SG (92 meses) | p |
|---------------------|-------------|-------------|---------------|------|
| MSI | MSS | Metilado | 53,6% | 0,11 |
| | | No metilado | 62,5% | |
| | MSI-L | Metilado | 71,2% | 0,76 |
| | | No metilado | 74,0% | |
| | MSI-H | Metilado | 100% | 0,15 |
| | | No metilado | 70,7% | |
| <i>hMLH1</i> | Metilado | Metilado | 78,7% | 0,43 |
| | | No metilado | 100% | |
| | No metilado | Metilado | 71,7% | 0,76 |
| | | No metilado | 78,8% | |

6.5.3 Análisis estratificado de la supervivencia global entre la mutación V600E del gen *BRAF* y la metilación MET2

Se ha estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre la mutación del gen *BRAF* y la variable MET2 (Tabla XXXVI).

En el análisis estratificado de MET2 respecto a la mutación del gen *BRAF* no se observan diferencias en la SG. En los pacientes con *BRAF* mutado la SG a los 92 meses fue del 85,7% cuando se observaba metilación MET2 y de 33,3% cuando no había metilación ($p=0,56$). En el grupo de pacientes con *BRAF* no mutado la supervivencia fue del 80,0% y de 78,5% en aquellos con MET2 y en ausencia de esta, respectivamente ($p=0,84$).

Tabla XXXVI: Análisis estratificado de la supervivencia global entre las variables genéticas y la metilación MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| Variable | Categorías | MET2 | SG (92 meses) | p |
|-------------|------------|-------------|---------------|------|
| BRAF | Mutado | Metilado | 85,7% | 0,56 |
| | | No metilado | 33,3% | |
| | No mutado | Metilado | 80,0% | 0,84 |
| | | No metilado | 78,5% | |

6.6 ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

Una vez establecidas las variables que influyen en la SG analizamos la importancia relativa de los factores pronóstico, valorada con el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Este análisis multivariable permite establecer cuáles de los factores relacionados con la SG presentan valor pronóstico independiente. En este modelo se incluyeron la metilación de *P16*, la variable MET2, la mutación del gen *BRAF*, la MSI, la edad, el estadio de Dukes y la localización del tumor.

Las variables que presentaron valor pronóstico independiente en el riesgo de fallecer de los pacientes con carcinoma colorrectal fueron la edad ($p<0,001$), el estadio tumoral ($p<0,001$) y la MSI ($p=0,008$).

La probabilidad de fallecer de los pacientes mayores de 71 años fue 2,8 veces superior a la de los pacientes menores de esa edad ($HR=2,83$, $IC95\%=1,89-4,23$) ($p<0,001$).

Respecto al estadio de Dukes, la probabilidad de fallecer de los pacientes con tumores en estadio C fue 5 veces superior a la de los pacientes en estadios precoces (A o B) (HR=5,04, IC95%=2,7-9,33) ($p<0,001$). Los pacientes con tumores en estadio D presentaron una probabilidad de fallecer 35 veces mayor que la de los pacientes en estadios A o B (HR=35,2, IC95%=19,6-63,06) ($p<0,001$).

La MSI también mostró significado pronóstico independiente. La HR de los pacientes con MSI-L fue de 1,9 (IC95%=0,48-7,82) y con MSS del 4,38 (IC95%=1,38-13,88) con respecto a los pacientes con tumores MSI-H. Los pacientes que presentaban MSI-H tenían un menor riesgo de fallecer.

En el caso de la metilación de *PI6* no se encontraron resultados estadísticamente significativos, sin embargo ajustado a nivel global se observa una reducción del riesgo del 12,0% para la ausencia de metilación con una HR de 0,88 (IC95%=0,56-1,39).

Se realizó un análisis multivariable estratificado en función de la localización del tumor. En el análisis se incluyeron el estadio tumoral, la edad, el sexo y MET2. En colon proximal la variable MET2 se comporta como factor pronóstico independiente ($p=0,006$) aunque el HR es indeterminado. Para la localización distal solo MET2 permaneció en el modelo, $p=0,03$, con un HR indeterminado.

7. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

7.1 ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

La SLE fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la fecha del diagnóstico de la primera recurrencia.

En el estudio de la SLE se excluyeron 57 pacientes en los que se realizó una cirugía paliativa por presentar metástasis irresecables en el diagnóstico.

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 92 meses (rango intercuartílico $P_{25}=75$ meses y $P_{75}=111$ meses). Todos los análisis de la SLE quedan referidos a la mediana del tiempo de supervivencia.

En 69 pacientes se diagnosticó recurrencia del tumor; 14 locorregionales y 55 a distancia.

La SLE de los pacientes a los 92 meses fue del 71,6% (Figura 53).

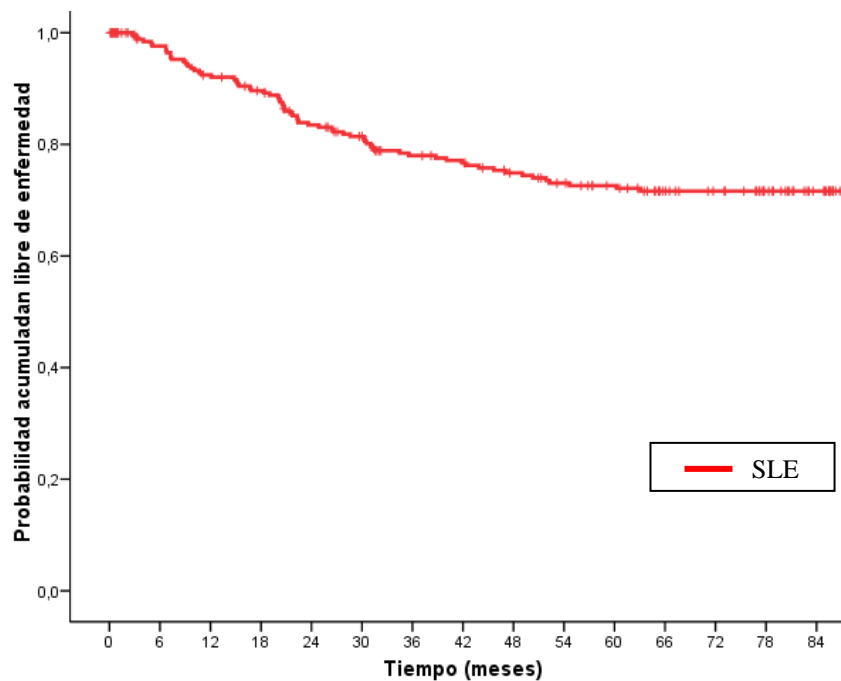


Figura 53: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR.

7.2 ANÁLISIS UNIVARIABLE DE LA PROBABILIDAD ACUMULADA DE RECIDIVAR EN LOS PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

Se estudió la relación de las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos con la SLE de los pacientes con CCR.

En la tabla XXXVII se muestra la SLE de los pacientes con respecto a las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos, así como el riesgo de recidivar que presentaban.

La edad y el sexo no presentaron significación pronóstica respecto al riesgo de recidivar.

De los factores pronóstico clásicos estudiados, sólo el estadio de Dukes mostró asociación significativa con la SLE. En el estadio C la HR de recidivar de los pacientes fue 3 veces mayor que la de los pacientes en estadio A o B. La HR de recidivar en los 14 pacientes en estadio D en los que se ha realizado cirugía curativa fue 8 veces mayor que la de los pacientes en estadios A o B ($p < 0,001$) (Figura 54).

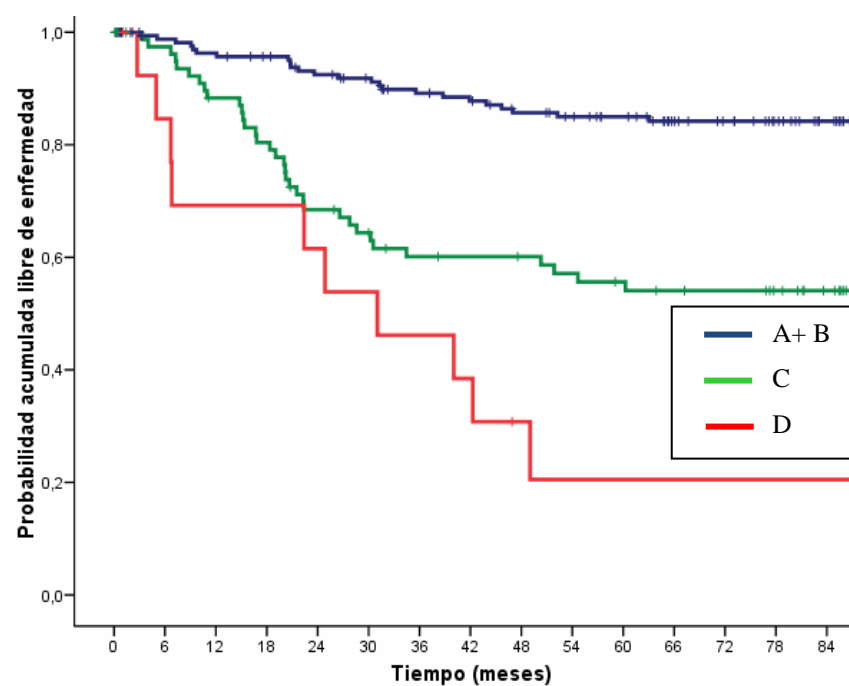


Figura 54: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según el estadio de Dukes.

Tabla XXXVII: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con las variables clínico-patológicas en los pacientes con CCR con cirugía curativa.

| Variable | Categorías | SLE (92 m) | HR* | IC 95% | p |
|--------------------------------|----------------|------------|------|------------|--------|
| Sexo | Hombres | 70,3% | 1,2 | 0,7 - 1,9 | 0,45 |
| | Mujeres | 73,0% | | | |
| Edad | ≥ 71 años | 69,9% | 1,1 | 0,7 - 1,8 | 0,49 |
| | < 71 años | 73,4% | | | |
| Dukes | A+B | 84,2% | | | <0,001 |
| | C | 54,1% | 3,7 | 2,2 - 6,3 | |
| | D | 20,5% | 8,2 | 3,9 - 17,2 | |
| Localización | Proximal | 74,9% | 1,1 | 0,5 - 2,1 | 0,1 |
| | Distal | 62,0% | 1,7 | 1 - 3 | |
| | Recto | 77,1% | | | |
| Tipo Histológico | Adenocarcinoma | 73,0% | 0,55 | 0,2 - 1,1 | 0,14 |
| | Mucoide | 54,0% | | | |
| Grado de diferenciación | I | 72,8% | 1,04 | 0,5 - 1,9 | 0,24 |
| | II | 73,0% | | | |
| | III | 55,6% | 2,7 | 0,9 - 7,6 | |

IC95%: intervalo de confianza 95%. Significación estadística: $p < 0,05$. * Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

7.3 ANÁLISIS UNIVARIABLE DE LA PROBABILIDAD ACUMULADA DE RECIDIVAR DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL EN RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES GENÉTICA ESTUDIADAS

7.3.1 Mutación V600E del gen *BRAF*

Se ha analizado si la mutación V600E del gen *BRAF* confería diferencias en el riesgo de recaer de los pacientes.

El análisis de la mutación del gen *BRAF* no determinaba diferencias en la SLE de los pacientes (Figura 55). Los pacientes con la mutación presentaron una SLE del 76,2%, mientras que la SLE era del 70,6% cuando el promotor no se encontraba metilado ($p=0,75$) (Tabla XXXVIII).

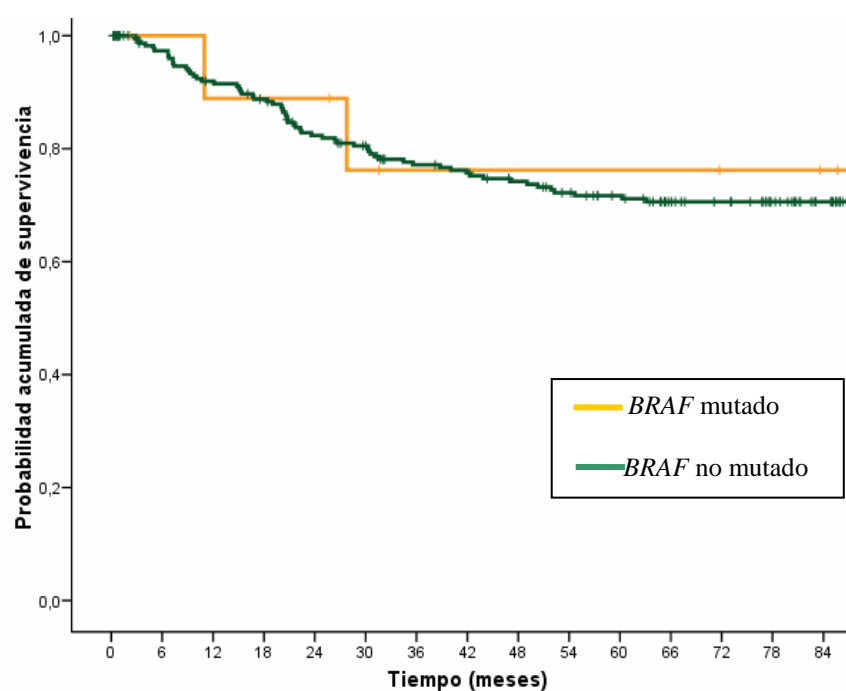


Figura 55: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de la mutación V600E en el gen *BRAF*.

Tabla XXXVIII: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con la mutación V600E del gen *BRAF*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | SLE (92 m) | HR* | IC 95% | p |
|-------------|------------|------------|-----|-------------|------|
| <i>BRAF</i> | Mutado | 76,2% | 0,8 | 0,19 - 3,29 | 0,75 |
| | No mutado | 70,6% | | | |

* Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

7.3.2 Metilación del promotor del gen *P16*

Se ha analizado si la metilación de la región promotora del gen *P16* confería diferencias en el riesgo de recaer de los pacientes.

El análisis de la metilación de la región promotora del gen *P16* no determinaba diferencias en la SLE de los pacientes (Figura 56). Los pacientes con metilación del gen presentaron una SLE del 78,2%, mientras que la SLE era del 70,3% cuando el promotor no se encontraba metilado ($p=0,32$) (Tabla XXXIX).

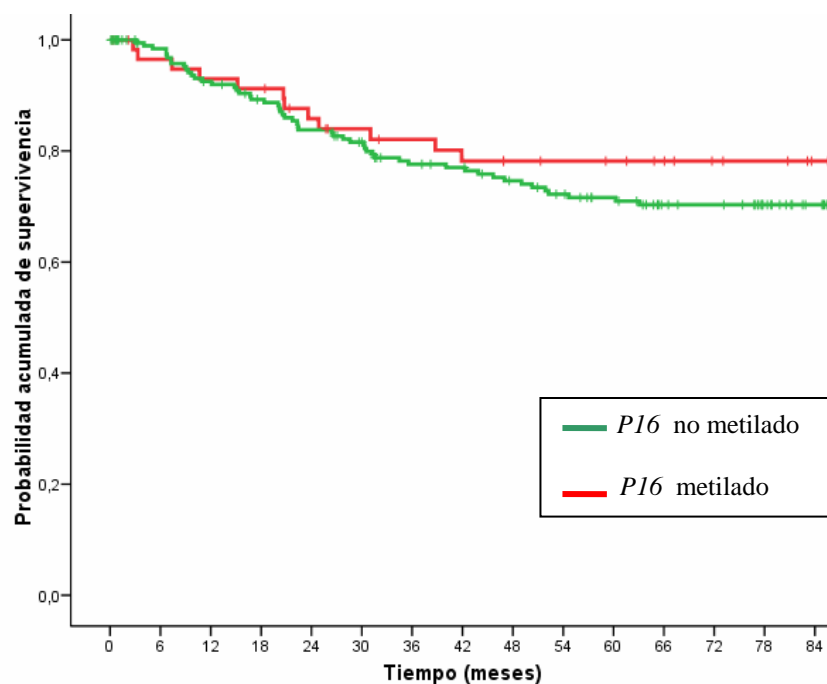


Figura 56: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de la metilación del promotor del gen *P16*.

Tabla XXXIX: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con la metilación del promotor del gen *P16*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | SLE (92m) | HR* | IC 95% | p |
|-------------------|-------------|-----------|------|-----------|------|
| <i>P16</i> | Metilado | 78,2% | 0,73 | 0,3 - 1,3 | 0,32 |
| | No metilado | 70,3% | | | |

* Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

7.3.3 Metilación MET2

Se ha analizado si en el subgrupo de pacientes que presentaba MSI, la metilación MET2 que agrupa la metilación de las regiones promotoras de los genes *hMLH1* y *P16* confería diferencias en el riesgo de recaer de estos pacientes.

El análisis de la metilación MET2 mostró asociación significativa con la SLE, los pacientes con metilación presentaron una SLE del 100%, mientras que la SLE era del 79,5% cuando el promotor no se encontraba metilado ($p=0,04$). En los pacientes sin MET2 el RR de recaer fue 97,2% mayor que la de los pacientes con metilación MET2 (Tabla XL) (Figura 57).

Tabla XL: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con la variable genética MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| Variable | Categorías | SLE (92 m) | HR* | IC 95% | p |
|-------------|-------------|------------|-------|----------|-------------|
| MET2 | Metilado | 100% | 0,028 | 0 - 42,1 | 0,04 |
| | No metilado | 79,5% | | | |

* Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

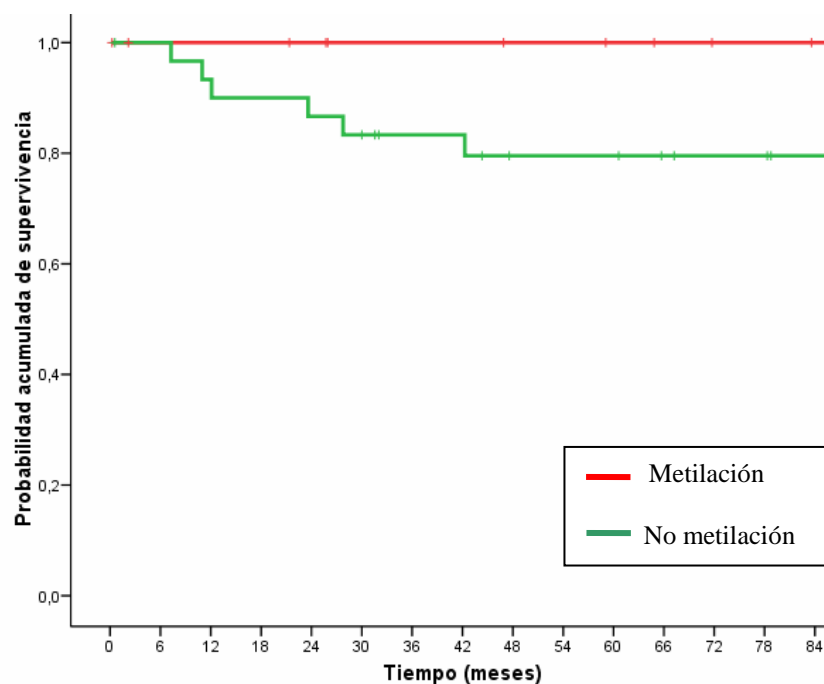


Figura 57: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según la presencia de la metilación MET2

7.4 ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD ENTRE LOS FACTORES PRONÓSTICO Y LAS VARIABLES GENÉTICAS

7.4.1 Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico y la mutación V600E del gen *BRAF*

Se ha estudiado la SLE en los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la mutación V600E del gen *BRAF*. El análisis estratificado se muestra en la tabla XLI.

Con respecto a la estratificación por el sexo de los pacientes, se observó que en los hombres con mutación en *BRAF* la SLE era del 33,3% y del 70,6% sin mutación ($p=0,17$). En las mujeres la SLE fue del 100% en aquellas que tenían tumores mutados y del 70,7% en las que no tenían tumores mutados ($p=0,19$).

En el análisis estratificado por edad, en los pacientes con edad mayor o igual de 71 años se observó una SLE del 83,3% en presencia de la mutación V600E y del 68,2% en ausencia de la mutación ($p=0,64$). En el grupo de pacientes con edad inferior a 71 años, la SLE fue del 66,7% en los pacientes con tumores mutados y del 73,0% en los no mutados ($p=0,89$).

En el análisis estratificado según el estadio de Dukes, todos los pacientes con tumores en estadio A o B y la mutación V600E sobrevivieron a los 93 meses, presentando una SLE del 100% mientras que los no mutados tuvieron una SLE del 84,0% ($p=0,39$). La SLE de los pacientes con tumores en estadio C fue del 50,0% en aquellos que presentaban mutación en *BRAF* y del 51,3% en los que no tenían la mutación ($p=0,93$). En el grupo de pacientes con tumores en estadio D ningún tumor tuvo mutación en el gen *BRAF*.

En relación a la estratificación según la localización del tumor, se observó que solo aparecían tumores con la mutación del gen *BRAF* en la localización proximal del colon. En los tumores de colon de localización proximal la SLE era del 76,2% para aquellos que presentaban *BRAF* mutado y del 74,2% en ausencia de la mutación ($p=0,89$).

Respecto al tipo histológico se observó que en los adenocarcinomas la SLE fue del 87,5% en los pacientes que presentaban la mutación V600E y del 72,0% en los que no la presentaban ($p=0,48$). Sin embargo, en los pacientes con tumores de tipo histológico mucinoso la SLE fue del 0% en los tumores mutados y del 51,3% en los no mutados ($p=0,28$).

Cuando estratificamos por el grado de diferenciación, observamos que los pacientes con tumores grado I tenían una SLE del 66,7% en los tumores con mutación en *BRAF* y del 72,7% en los tumores no mutados ($p=0,98$). En los pacientes con tumores grado II se observó una SLE del 66,7% y del 70,6% en presencia y en ausencia de la mutación de *BRAF* respectivamente ($p=0,72$). La SLE de los pacientes con tumores grado III fue del 100% en aquellos en los que aparecía la mutación V600E y del 42,9% en los que no la presentaban ($p=0,39$).

Tabla XLI: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico clásicos y la mutación V600E del gen *BRAF*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | <i>BRAF</i> | SLE (92 meses) | p |
|--------------------------------|----------------|---------------------|----------------|------|
| Sexo | Hombre | Mutado No mutado | 33,3% 70,6% | 0,17 |
| | Mujer | Mutado No mutado | 100% 70,7% | 0,19 |
| Edad | ≥ 71 años | Mutado No mutado | 83,3% 68,2% | 0,64 |
| | < 71 años | Mutado No mutado | 66,7% 73,0% | 0,89 |
| Dukes | A+B | Mutado No mutado | 100% 84,0% | 0,39 |
| | C | Mutado No mutado | 50,0% 51,3% | 0,93 |
| | D | Mutado No mutado | -- 20,5% | |
| Localización | Colon proximal | Mutado No mutado | 76,2% 74,2% | 0,89 |
| | Colon distal | Mutado No mutado | -- 60,0% | |
| | Recto | Mutado No mutado | -- 77,3% | |
| Histología | Adenocarcinoma | Mutado No mutado | 87,5% 72,0% | 0,48 |
| | Mucinoso | Mutado No mutado | 0% 51,3% | 0,28 |
| Grado de diferenciación | I | Mutado No mutado | 66,7% 72,7% | 0,98 |
| | II | Mutado No mutado | 66,7% 70,6% | 0,72 |
| | III | Mutado No mutado | 100% 42,9% | 0,39 |

7.4.2 Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico y la metilación del promotor del gen *P16*

Se ha estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el valor de la determinación del estado de metilación de la región promotora del gen *P16*. Este análisis estratificado se muestra en la tabla XLII.

En relación al sexo de los pacientes, se observó que en los hombres con metilación de la región promotora la SLE a los 92 meses era del 69,0% y en ausencia de metilación la SLE fue del 71,2% ($p=0,71$). En las mujeres se observó una SLE del 86,0% cuando existía metilación y un 69,5% en ausencia de metilación ($p=0,13$).

Con respecto a la edad de los pacientes, en aquellos con edad mayor o igual a 71 años la SLE a los 92 meses fue del 79,3% con metilación y del 67,0% sin metilación ($p=0,29$). Los resultados fueron similares en el grupo de pacientes menores de 71 años. Estos presentaron una SLE del 76,2% cuando se observaba metilación y del 73,0% cuando no existía metilación ($p=0,89$).

En el análisis estratificado del estadio de Dukes, los pacientes con tumores en estadios A o B presentaron una SLE a los 92 meses del 88,1% en los tumores metilados y del 100% en tumores sin metilación ($p=0,42$). La SLE de los tumores en estadio C fue del 70,6% en el caso de los metilados y del 50,1% en los que no mostraban

metilación ($p=0,49$). En los tumores en estadio D se observó una SLE del 25,0% tanto en los tumores que presentaban metilación como en los que no la presentaban ($p=0,53$).

En el análisis estratificado de la localización tumoral se observó que cuando el tumor estaba localizado en colon proximal, la SLE de los pacientes a los 92 meses era del 90,5% y del 68,4% para los tumores con la región promotora metilada y en ausencia de metilación, respectivamente ($p=0,16$). Para la localización distal del colon, la SLE en los tumores metilados fue del 54,5% y en los no metilados del 64,1% ($p=0,43$). En el caso de los pacientes con tumores localizados en recto la SLE fue del 79,5% para aquellos con metilación y del 77,6% para aquellos que no se encontraban metilados ($p=0,79$).

Respecto al tipo histológico se observó que en adenocarcinomas la SLE a los 92 meses fue del 78,8% para los pacientes que presentaban metilación y del 72,2% para los que no presentaban metilación ($p=0,43$). En el caso de los tumores mucinosos la SLE en los tumores con metilación fue del 66,7% y del 47,6% en los que no existía metilación ($p=0,88$).

Al estudiar el grado de diferenciación, observamos que los pacientes con tumores de grado I tenían una SLE del 78,4% en el caso de los metilados y del 71,1% cuando no existía metilación ($p=0,56$). Los tumores de grado II presentaron una SLE del 75,0% cuando estaban metilados, y del 71,8% cuando no lo estaban ($p=0,96$). En los tumores de grado III la metilación de *P16* marcaba diferencias significativas en la SLE.

La SLE a los 92 meses fue del 100% en los tumores metilados, mientras que en los que no tenían metilación la SLE fue del 0% ($p=0,005$) (Figura 58).

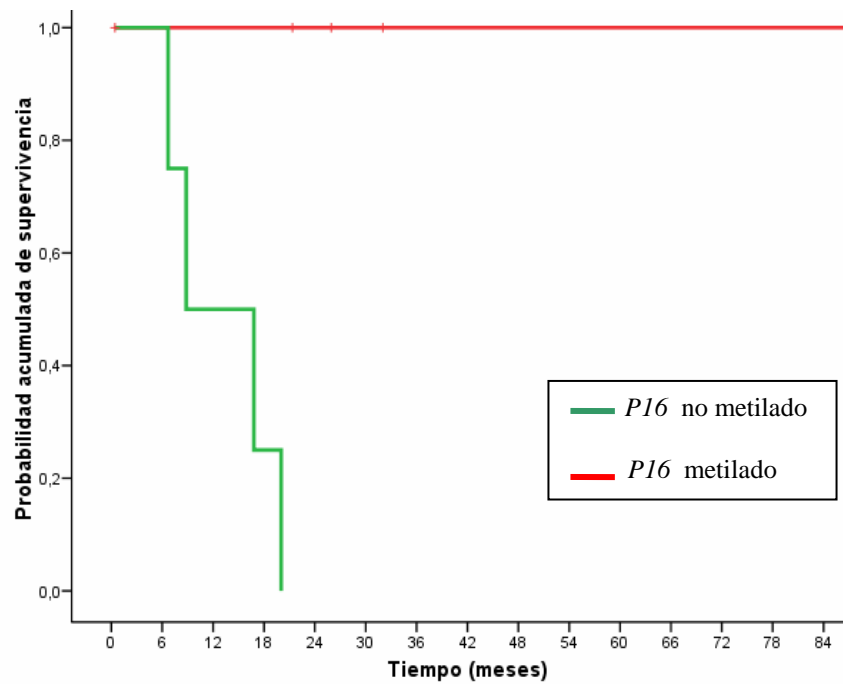


Figura 58: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación del promotor de *P16* en los tumores colorrectales con grado III de diferenciación.

Tabla XLII. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico clásicos y la metilación del promotor de *P16*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | <i>P16</i> | SLE (92 meses) | p |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|----------------|--------------|
| Sexo | Hombre | Metilado No metilado | 69,0% 71,2% | 0,71 |
| | Mujer | Metilado No metilado | 86,0% 69,5% | 0,13 |
| Edad | ≥ 71 años | Metilado No metilado | 79,3% 67,0% | 0,29 |
| | < 71 años | Metilado No metilado | 76,2% 73,0% | 0,89 |
| Dukes | A+B | Metilado No metilado | 88,1% 100% | 0,42 |
| | C | Metilado No metilado | 70,6% 50,1% | 0,49 |
| | D | Metilado No metilado | 25,0% 25,0% | 0,53 |
| Localización | Colon proximal | Metilado No metilado | 90,5% 68,4% | 0,16 |
| | Colon distal | Metilado No metilado | 54,5% 64,1% | 0,43 |
| | Recto | Metilado No metilado | 79,5% 77,6% | 0,79 |
| Histología | Adenocarcinoma | Metilado No metilado | 78,8% 72,2% | 0,43 |
| | Mucinoso | Metilado No metilado | 66,7% 47,6% | 0,88 |
| Grado de diferenciación | I | Metilado No metilado | 78,4% 71,1% | 0,56 |
| | II | Metilado No metilado | 75,0% 71,8% | 0,96 |
| | III | Metilado No metilado | 100% 0% | 0,005 |

7.4.3 Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico y la metilación MET2

Se ha estudiado la SLE de los pacientes con tumores que presentaban MSI mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el valor de la determinación de la variable MET2, que agrupa la metilación de la región promotora del gen *hMLH1* y la metilación del promotor del gen *P16*. Este análisis estratificado se muestra en la tabla XLIII.

En el análisis estratificado de los factores pronóstico con respecto a la metilación MET2 la SLE a los 92 meses en presencia de la metilación MET2 fue del 100% en todos los casos, tanto para las variables clínico-patológicas como para los factores pronóstico clásicos. En el caso de los tumores de localización en colon distal y de los tumores con histología mucinosa no se observó ningún tumor con metilación MET2.

En el análisis estratificado de la edad de los pacientes, la metilación MET2 marcaba diferencias clínicamente significativas en la SLE a los 92 meses. En aquellos pacientes con edad mayor o igual a 71 años la SLE a los 92 meses fue del 100% con metilación y del 76,5% sin metilación ($p=0,09$) (Figura 59).

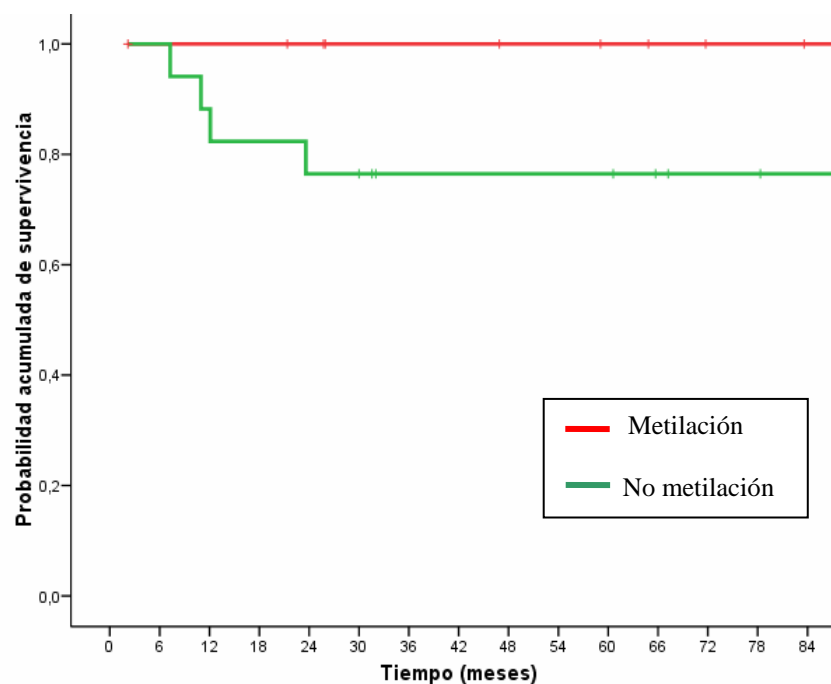


Figura 59: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación MET2 en los pacientes con CCR con 71 años o más.

En el análisis estratificado de la localización tumoral se observó que cuando el tumor estaba localizado en colon proximal, la variable MET2 marcaba diferencias estadísticamente significativas en la SLE de los pacientes a los 92 meses siendo la SLE del 100% para los tumores con MET2 y del 64,3% en ausencia de metilación ($p=0,04$) (Figura 60). En el caso de los pacientes con tumores localizados en recto hay que destacar que la SLE fue del 100% tanto si presentaban metilación MET2 como si no la presentaban.

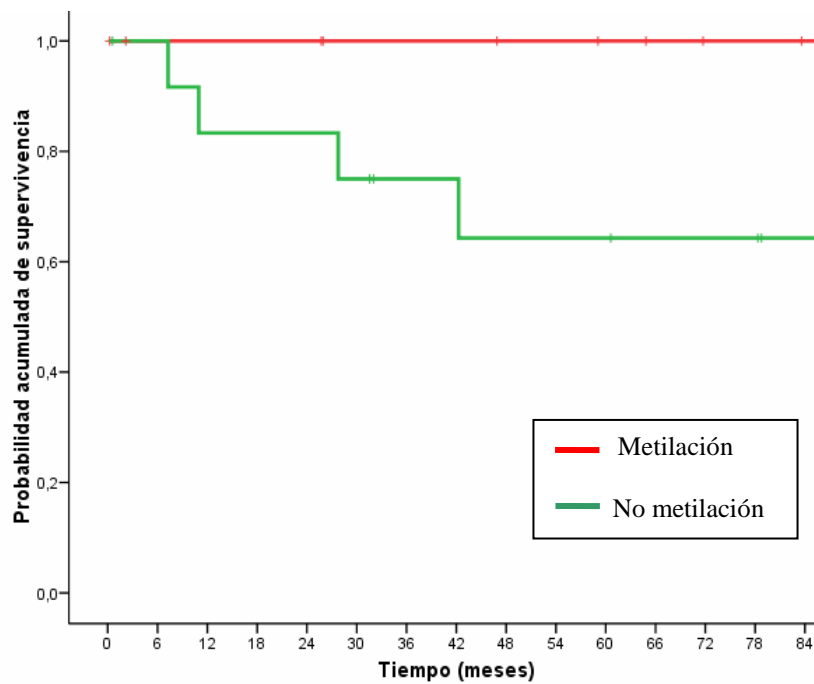


Figura 60: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación MET2 en tumores colorrectales con localización proximal.

En relación a la estratificación por grado de diferenciación, en los tumores con grado III la SLE a los 92 meses fue del 100% tanto en presencia como en ausencia de metilación MET2.

Tabla XLIII: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico clásicos y la metilación MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| Variable | Categorías | MET2 | SLE (92 meses) | p |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------|
| Sexo | Hombre | Metilado No metilado | 100% 73,3% | 0,58 |
| | Mujer | Metilado No metilado | 100% 85,6% | 0,21 |
| Edad | ≥71 años | Metilado No metilado | 100% 76,5% | 0,09 |
| | < 71 años | Metilado No metilado | 100% 84,6% | 0,57 |
| Dukes | A+B | Metilado No metilado | 100% 83,3% | 0,24 |
| | C | Metilado No metilado | 100% 80,0% | 0,39 |
| | D | Metilado No metilado | 100% 50,0% | 0,48 |
| Localización | Colon proximal | Metilado No metilado | 100% 64,3% | 0,04 |
| | Colon distal | Metilado No metilado | -- 80,0% | -- |
| | Recto | Metilado No metilado | 100% 100% | -- |
| Histología | Adenocarcinoma | Metilado No metilado | 100% 85,2% | 0,15 |
| | Mucinoso | Metilado No metilado | -- 33,3% | -- |
| Grado de diferenciación | I | Metilado No metilado | 100% 75,6% | 0,26 |
| | II | Metilado No metilado | 100% 83,3% | 0,41 |
| | III | Metilado No metilado | 100% 100% | -- |

7.5 ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD ENTRE LAS VARIABLES GENÉTICAS

Se ha estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables genéticas analizadas en este trabajo y en trabajos anteriores y las variables genéticas objeto de este estudio, mutación del gen *BRAF*, metilación del gen *P16* y metilación MET2.

7.5.1 Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre las variables genéticas y la mutación V600E del gen *BRAF*

Se ha estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables genéticas metilación de *P16*, MSI y metilación del promotor de *hMLH1* y la mutación del gen *BRAF* (Tabla XLIV).

En el análisis estratificado con respecto a la metilación de *P16*, en los pacientes con metilación en el promotor la SLE a los 92 meses fue del 100% en aquellos que presentaba la mutación V600E y de 72,5% en los que no la presentaban ($p=0,22$). En los pacientes sin metilación en *P16* la supervivencia fue del 50,0% en aquellos con la mutación de *BRAF* y del 100% en los que no la tenían ($p=0,23$).

Con respecto a la MSI se observó que en los pacientes con MSS y *BRAF* mutado la SLE a los 92 meses era del 100% y en los no mutados del 68,2% ($p=0,54$). En los pacientes con tumores MSI-L se observó una SLE del 66,7% cuando estaba presente la

mutación V600E y del 87,1% cuando no lo estaba ($p=0,24$). La SLE de los pacientes con MSI-H fue del 80,0% en los tumores con *BRAF* mutado y del 83,9% en los tumores sin la mutación ($p=0,75$).

En el análisis estratificado con respecto a la metilación de *hMLH1*, en los pacientes con metilación en *hMLH1* la SLE fue del 76,2% cuando se observaba la mutación V600E y del 87,1% cuando no se observaba ($p=0,48$). En el caso de los tumores sin metilación en *hMLH1* hay que destacar ninguno tenía la mutación V600E.

Tabla XLIV: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre la MSI, la metilación de *hMLH1* y la metilación de *P16* y la mutación V600E del gen *BRAF*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | <i>BRAF</i> | SLE (92 meses) | P |
|--------------|-------------|---------------------|----------------|------|
| <i>P16</i> | Metilado | Mutado No mutado | 100% 72,5% | 0,22 |
| | No metilado | Mutado No mutado | 50,0% 100% | 0,23 |
| MSI | MSS | Mutado No mutado | 100% 68,2% | 0,54 |
| | MSI-L | Mutado No mutado | 66,7% 87,1% | 0,24 |
| | MSI-H | Mutado No mutado | 80,0% 83,9% | 0,75 |
| <i>hMLH1</i> | Metilado | Mutado No mutado | 76,2% 87,1% | 0,48 |
| | No metilado | Mutado No mutado | --- 84,6% | |

7.5.2 Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre las variables genéticas y la metilación del promotor del gen *P16*

Se ha estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado de las variables genéticas MSI y metilación del promotor de *hMLH1* con la metilación de *P16* (Tabla XLVI).

En el análisis estratificado con respecto a la MSI, observamos que los pacientes con tumores MSS tenían una SLE a los 92 meses del 69,7% en el caso de existir metilación en *P16* y del 68,8% cuando no existía metilación ($p=0,83$). En los pacientes con tumores MSI-L se observó una SLE del 87,5% en aquellos con metilación, mientras que en los que no presentaban metilación la SLE fue del 84,6% ($p=0,69$). En el grupo de pacientes MSI-H la SLE fue del 100% en aquellos con metilación y del 71,6% sin metilación ($p=0,14$).

Respecto a la metilación del gen *hMLH1*, la metilación de *P16* marcaba diferencias en la SLE a los 92 meses. Se observó que en los metilados para *hMLH1* la SLE a los 92 meses fue del 100% cuando también estaba metilado el gen *P16* y del 74,5% cuando no lo estaba ($p=0,07$) (Figura 61). En el caso de los tumores sin metilación en *hMLH1* la SLE fue del 75,0% y del 88,6% en presencia de metilación y en ausencia de metilación de *P16*, respectivamente ($p=0,62$).

Tabla XLV: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre la MSI y la metilación de *hMLH1* y la metilación de *P16*. Serie de pacientes con CCR.

| Variable | Categorías | <i>P16</i> | SLE (92 meses) | p |
|---------------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| MSI | MSS | Metilado | 69,7% | 0,83 |
| | | No metilado | 68,8% | |
| | MSI-L | Metilado | 87,5% | 0,69 |
| | | No metilado | 84,6% | |
| | MSI-H | Metilado | 100% | 0,14 |
| | | No metilado | 71,6% | |
| <i>hMLH1</i> | Metilado | Metilado | 100% | 0,07 |
| | | No metilado | 74,5% | |
| | No metilado | Metilado | 75,0% | 0,62 |
| | | No metilado | 88,6% | |

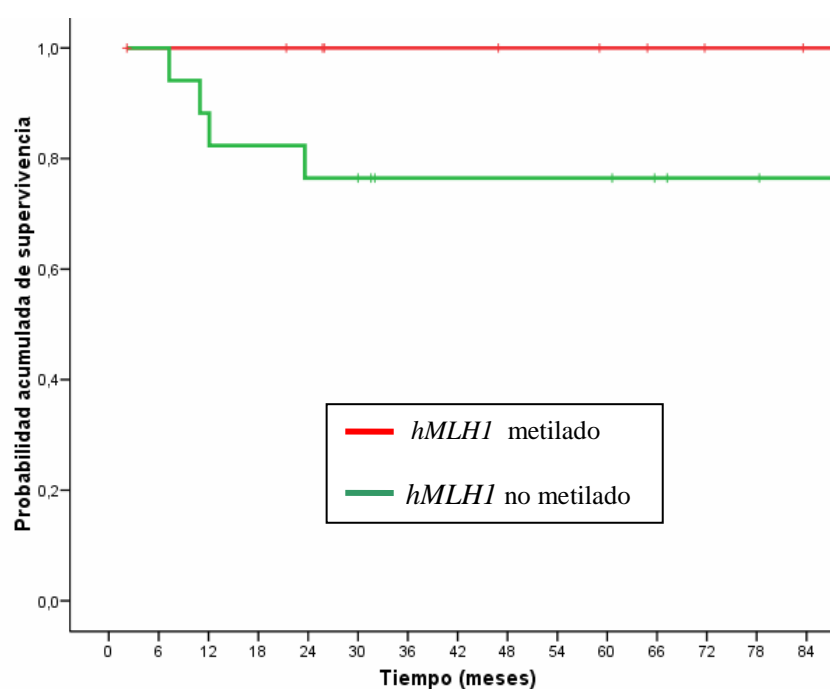


Figura 61: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación del promotor del gen *P16* en tumores colorrectales con metilación en el promotor del gen *hMLH1*.

7.5.3 Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre la mutación V600E del gen *BRAF* y la metilación MET2

Se ha estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre la mutación del gen *BRAF* y la variable MET2 (Tabla XLVI).

En el análisis estratificado de MET2 respecto a la mutación del gen *BRAF*, se observa que la mutación V600E marcaba diferencias en la SLE. En los pacientes con *BRAF* mutado la SLE a los 92 meses fue del 100% cuando se observaba metilación MET2 y de 33,3% cuando no había metilación ($p=0,06$) (Figura 62) En el grupo de pacientes con *BRAF* no mutado la supervivencia fue del 100% y de 82,1% en aquellos con MET2 y en ausencia de esta, respectivamente ($p=0,35$).

Tabla XLVI: Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre la mutación V600E del gen *BRAF* y MET2. Serie de pacientes con CCR y MSI.

| Variable | Categorías | MET 2 | SLE (92 meses) | p |
|-------------|------------|-------------|----------------|-------------|
| <i>BRAF</i> | Mutado | Metilado | 100% | 0,06 |
| | | No metilado | 33,3% | |
| | No mutado | Metilado | 100% | 0,35 |
| | | No metilado | 82,1% | |

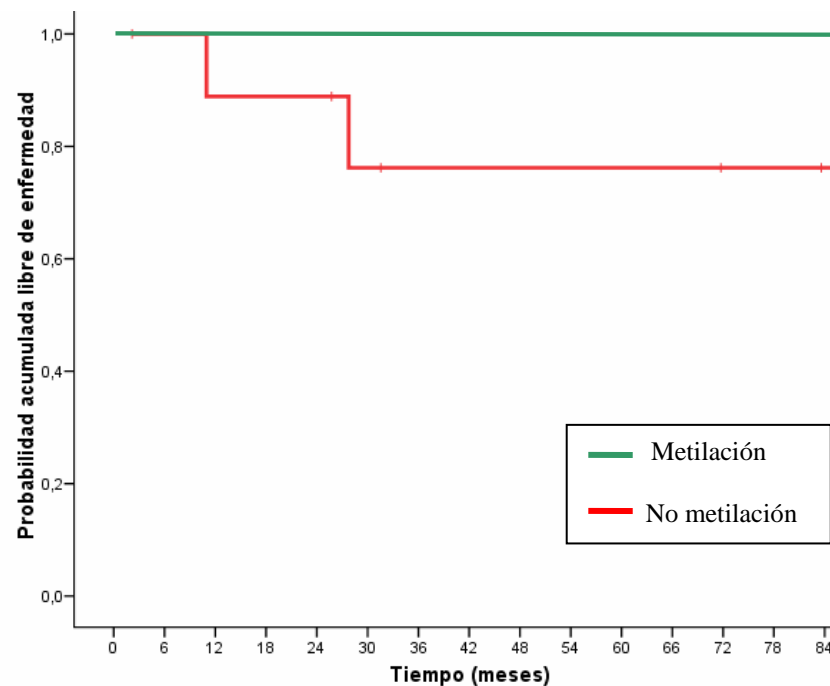


Figura 62: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada según la presencia de metilación MET2 en tumores colorrectales con la mutación V600E del gen *BRAF*.

7.6 ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Una vez establecidas las variables pronósticas que influyen en la SLE analizamos la importancia relativa de cada una de ellas, mediante un análisis multivariable. En este modelo de análisis se incluyeron la metilación de *P16*, la variable MET2, la mutación del gen *BRAF*, la MSI, la edad, el estadio de Dukes y la localización del tumor.

Las variables que presentaron valor pronóstico independiente en el riesgo de recaer de los pacientes con carcinoma colorrectal fueron la edad ($p=0,031$), el estadio tumoral ($p<0,001$) y la MSI ($p=0,019$).

La probabilidad de recaer de los pacientes mayores de 71 años fue 1,7 veces superior a la de los pacientes de edad inferior (HR=1,7, IC95%=1,05-2,82).

Respecto al estadio de Dukes, la probabilidad de recaer de los pacientes con tumores en estadio C fue 4,27 veces superior a la de los pacientes en estadios precoces (A o B) (HR=4,27, IC95%=2,51-7,24). Los pacientes con tumores en estadio D presentaron una probabilidad de fallecer 12 veces mayor que la de los pacientes en estadios A o B (HR=12, IC95%=5,5-26,19) ($p<0,001$).

La MSI también mostró significado pronóstico independiente. La HR de los pacientes con MSI-L fue de 1,5 (IC95%=0,29-7,69) y con MSS del 4,1 (IC95%=1,25-13,29) con respecto a los pacientes con tumores MSI-H. Los pacientes que presentaban MSI-H tenían un menor riesgo de recaer.

Con respecto a la variable MET2 no se pudo realizar el análisis multivariable ya que la SLE de los pacientes que presentan metilación MET2 es del 100%, no recaeró ninguno.

DISCUSIÓN

El cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad. En España es la segunda causa de muerte y cada año aumenta su incidencia, sin embargo disminuye su mortalidad lo cual refleja los avances en el diagnóstico precoz y el tratamiento. El cáncer en España es por tanto un problema de salud prioritario.

En los últimos años, la investigación se ha centrado en la identificación de factores pronóstico que sirvan de ayuda en el tratamiento y seguimiento de los pacientes de una manera más individualizada. En años precedentes, las decisiones terapéuticas se basaban en parámetros clínicos e histopatológicos clásicos, que no resultaban suficientemente sensibles y específicos.

Los avances en las diferentes tecnologías de análisis del ADN hacen posible el estudio del código genético del cáncer. El desarrollo del diagnóstico molecular para la detección temprana del CCR es la principal traducción de la genética del cáncer en la práctica clínica. El CCR nos proporciona el mejor ejemplo de utilidad de esta tecnología, ya que se han identificado más de 140 genes que contribuyen al fenotipo del cáncer.²⁰⁹

El número de mutaciones somáticas que contribuyen al proceso carcinogénico del CCR parece ser mucho más amplio de lo que se esperaba. Sjöblom y cols. analizaron más de 13.000 genes en diferentes series de CCR y cáncer de mama y encontraron 191 genes candidatos a una selección mutacional durante la tumorigénesis. En el CCR 69 de estos genes se clasificaron como altamente relevantes para la

patogénesis, de manera individual cada tumor acumulaba una media de 9 mutaciones. Además cada tumor estudiado poseía una huella de genes mutados diferentes.²⁵⁰

Existen al menos 3 rutas principales mediante las cuales estos eventos moleculares pueden dar lugar a CCR. La mayoría de los CCR se asocian con cambios que provienen de una inestabilidad cromosómica, el 10% de los CCR poseen patrones característicos de hipermetilación génica y un 15% presentan MSI.^{251,252}

Sin embargo la baja frecuencia de muchas de las mutaciones en los genes candidatos genera una gran heterogeneidad entre los CCR, lo que se refleja en la disparidad en su comportamiento clínico. Este alto grado de heterogeneidad hace que sea más difícil determinar el efecto clínico de las mutaciones individuales.²⁰⁹

Los estudios cuyo objetivo es la comprensión del CCR a nivel molecular, proporcionan herramientas importantes para el establecimiento de marcadores genéticos útiles para la selección de pacientes aptos para terapias concretas, y el diagnóstico molecular necesario para la detección no invasiva de tumores tempranos.

Algunos marcadores moleculares ya se han incorporado en el manejo del CCR. Así el conocimiento del estado mutacional del gen *KRAS* en el tumor primario es un predictor de la resistencia a los anticuerpos monoclonales del EGFR.^{253,254} La quinasa que resulta de la transcripción de este gen actúa en la vía de quinasas RAS/RAF/MEK/ERK, que media la respuesta celular a las señales de crecimiento, y es esencial en la señalización intracelular desde los receptores activados de la superficie

celular hasta los factores de transcripción en el núcleo. Uno de los tres genes *RAF* de esta vía es *BRAF*, en el que la sustitución de una sola base provoca la mutación V600E localizada en el dominio quinasa de la proteína. Esta mutación provoca una activación constitutiva de la quinasa BRAF, confiriéndole un potencial oncogénico. Las mutaciones de los genes *KRAS* y *BRAF* son excluyentes, lo que refleja la importancia de esta ruta de señalización en la carcinogénesis.²⁵⁵

El análisis de las mutaciones en *BRAF* se ha propuesto como diana terapéutica. Su estudio podría ser útil en pacientes sin *KRAS* mutado y que son candidatos para recibir terapia anti-EGFR. Capuzzo y cols. mostraron que los pacientes con la mutación V600E no respondían a la terapia anti-EGFR y que tenían una evolución negativa en el tiempo de progresión y en la supervivencia.²⁵⁶ La importancia de las mutaciones de *BRAF* también destacó en el estudio de Sharma y col. que observaron que la activación de ERK se correlaciona mejor con mutaciones de *BRAF* que con las de *KRAS*, sugiriendo que la mutación de *BRAF* puede predecir mejor la respuesta a los fármacos como los inhibidores de MEK.²⁵⁵ Estos trabajos impulsan el establecimiento del análisis mutacional de *BRAF* ya que puede ser de gran utilidad en la evaluación del pronóstico del tumor y un predictor en la respuesta a tratamientos.

En este estudio se ha determinado la frecuencia y el significado clínico de la mutación V600E del gen *BRAF* y la metilación del promotor del gen *P16* en una cohorte prospectiva de 326 pacientes intervenidos por CCR. También hemos analizado la relación de estas alteraciones con otros parámetros estudiados anteriormente en nuestro grupo, la MSI y la metilación del promotor del gen *hMLH1*. Todos los pacientes

fueron intervenidos siguiendo un mismo protocolo quirúrgico, ya que el manejo quirúrgico del paciente puede tener gran influencia en el pronóstico de los pacientes.²⁵⁷ Para trabajar con una población homogénea se excluyeron de nuestro estudio los casos de carcinomas metacrónicos, las poliposis familiares, pacientes con criterios de HNPCC y pacientes que habían recibido tratamiento neoadyuvante.

El estudio en conjunto de los cuatro tipos de alteraciones los podemos justificar ya que todas están implicadas en la vía de la metilación o CIMP. La mutación V600E es un marcador de CCR esporádico en tumores con MSI-H que presentan con elevada frecuencia metilación del gen *hMLH1* y se desarrollan por el fenotipo metilador. Este fenotipo también está fuertemente asociado a la metilación de *P16*.^{225,229}

La frecuencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en el CCR esporádico varía entre el 4 y el 18% en la mayoría de los estudios²⁵⁸⁻²⁶⁴ y se asocia fuertemente con la vía genética de la MSI.^{259,265,266} La mutación V600E aparece en más del 30% de los MSI-H,^{259,260,263,264} ya que parte de los tumores MSI se desarrollan a través de la vía de *BRAF*, aunque aún no se ha establecido un mecanismo concreto que describa este proceso. En este estudio el 4% de los tumores presentan esta mutación en *BRAF* y es significativamente más frecuente en los MSI, principalmente en los MSI-H (30%), lo que concuerda con los estudios previos.

Algunos autores encuentran frecuencias más elevadas para la mutación de *BRAF*. En estos trabajos la frecuencia de MSI-H es muy elevada, del 36% y 41%, por lo

que la población estudiada difiere a la de este trabajo, en la que la frecuencia de MSI-H es del 6% y la de MSI total del 15%.^{267,268}

El grupo de tumores en los que aparece implicada la vía MSI con alteración de *BRAF* tienen características clínico-patológicas de MSI como edad avanzada, sexo femenino, localización proximal, histología mucinosa y bajo grado de diferenciación.^{259,267,268} Sin embargo, nuestro estudio solo encontró relación significativa de la mutación V600E con la localización proximal.

La distribución de la mutación V600E es heterogénea a lo largo del colon y el recto debido a la asociación entre *BRAF* y MSI. Los tumores localizados en recto se desarrollan con menor frecuencia a partir de la vía genética de MSI con alteración en *BRAF*, en este trabajo ninguno de los tumores con *BRAF* mutado se localizó en el recto. Muchos estudios analizan conjuntamente los tumores de colon y recto. El colon distal y el recto tienen el mismo origen embrionario y además el desarrollo carcinogénico en colon y recto sigue las mismas vías por lo que es lícito su estudio en conjunto. Algunas vías de desarrollo tumorogénico son más frecuentes en el colon y otras en el recto, e incluso que hay diferencias entre el colon proximal y el colon distal.

De acuerdo con algunos autores, el análisis de la MSI y de la mutación V600E en el recto muestra valores considerablemente menores a los obtenidos en el colon, observándose un 2,2% de MSI y un 2,8% de mutaciones en *BRAF*, en tumores de recto en este estudio.²⁶⁹ Esto corrobora la hipótesis de que esta vía carcinogénica es poco frecuente en los tumores rectales.

La MSI es el resultado de las alteraciones en la función de las proteínas MMR o del silenciamiento de estos genes reparadores del ADN,²⁶⁶ sin embargo estas alteraciones no explican en exclusividad la mutación de *BRAF*,²⁵⁹ ya que también puede producirse a consecuencia de la inactivación de otros genes no pertenecientes a este grupo.²⁶⁷

Wang y cols. analizan en 293 tumores junto a sus correspondientes tejidos sanos la MSI, la mutación V600E de *BRAF* y la expresión de los genes *hMLH1* y *hMSH2*. Este grupo defiende que las mutaciones en *BRAF* no son el resultado de MMR alterados. Cuando las mutaciones en los MMR *hMLH1* o *hMSH2* aparecen en la línea germinal, determinada por el análisis del tejido colónico sano, las mutaciones en *BRAF* aparecen en muy pocas ocasiones. Además, tumores con MMR no alterados o MSS, también muestran mutaciones en *BRAF*, aproximadamente en un 10% de los casos. Por lo tanto las mutaciones en *BRAF* no son consecuencia de MMR alterados por si solas.²⁶⁷ Aunque estos autores no han descrito los mecanismos alternativos por los que se producen estas alteraciones.

Ya que las mutaciones de *BRAF* son más frecuentes en CCR esporádicos con MMR alterados que en los casos de MMR mutados en la línea germinal, la principal diferencia puede estar en el mecanismo de iniciación o progresión entre los dos tipos de tumores. Estas diferencias pueden favorecer la selección de la mutación de *BRAF* en uno de los grupos tumorales comparado con el otro.²⁶⁷

Las mutaciones de *BRAF* son frecuentes tanto en CCR con MSI o con mucha metilación, como en los pólipos colorrectales de morfología serrada, que muestran la metilación generalizada en el ADN. Lo que sugiere que la mutación de *BRAF* y la metilación del ADN son eventos tempranos de desarrollo de los CCR MSI-H esporádicos a través de la vía serrada.²⁷⁰⁻²⁷²

Estudios más recientes, apoyan la teoría de que las mutaciones de *KRAS*, *BRAF* y la metilación de las islas CpG ocurren temprano en el proceso de la carcinogénesis, mientras que la MSI ocurre relativamente tarde.²⁷³⁻²⁷⁵

Tanaka y cols., sugieren un posible papel de las mutaciones de *KRAS* y *BRAF* en la metilación preferente de las islas CpG de locus específicos y observan como en las líneas celulares con *BRAF* mutado se induce la metilación de *hMLH1*.²⁷⁶ Así, la metilación de *hMLH1* es poco frecuente en los tumores sin la mutación de *BRAF*.²⁶⁸

La mutación de *BRAF* también es un fenómeno frecuente en CIMP-H que no son MSI-H pero con menor frecuencia que en los CIMP-H con MSI-H. Esto indica que *BRAF* está fuertemente asociado con la metilación generalizada del ADN y no solo con la del *hMLH1*.^{268,277}

La mutación V600E se asocia fuertemente con la hipermetilación génica en este trabajo, ya que la distribución de su frecuencia en función de este parámetro varía significativamente. Cuando analizamos la metilación en un único gen, la frecuencia de la mutación de *BRAF* pasa de un 2,2% en los tumores no metilados a un 11,1% en los

metilados para el caso de *P16* y para *hMLH1* pasa de ausencia de mutación en *BRAF* a un 35,5% para el caso de metilación. Cuando se analizan en conjunto las dos metilaciones la frecuencia de la mutación V600E pasa de un 13% en ausencia de metilación conjunta a un 50% con MET2. La relación entre la mutación de *BRAF* y la metilación puede confirmar la contribución de esta mutación a la hipermetilación en múltiples genes. Esta asociación es más fuerte en los MSI, el 61% de *BRAF* mutados tienen metilación de *P16*, el 63% de *BRAF* mutado tiene MET2.

En los tumores MSS la mutación de *BRAF* se asocia con un peor pronóstico,^{162,228,260,278} en nuestro estudio la baja frecuencia de la mutación V600E en los tumores MSS no nos permite ver esta asociación. Los tumores MSI tienen una mejor SG, y esto es independiente del estado de *BRAF*, por lo que la mutación V600E por sí sola no confiere un peor pronóstico en este grupo de pacientes.^{260,278} En el análisis estratificado respecto a la MSI, tanto en los pacientes con MSS como en los que presentan MSI, observamos una tendencia a un peor pronóstico en aquellos que tienen mutación de *BRAF*, aunque no se puede confirmar estadísticamente debido al reducido tamaño muestral que tiene cada uno de los subgrupos. La mutación V600E tiene una prevalencia muy baja pero parece claro su efecto adverso en la evolución de los pacientes ya que confiere mayor resistencia frente a los estímulos apoptóticos por lo que promueve la transformación e invasión celular, y por tanto, la tumorigénesis.^{273,278,279}

La mutación V600E proporciona peor supervivencia en el subgrupo de tumores de localización distal, el único paciente con *BRAF* mutado y localización distal muere a causa del tumor. La localización más frecuente para la mutación del gen *BRAF* es la

proximal^{259,267,268} y es en esta localización en la que a través de la MSI se observan relaciones con la SG, aunque nosotros no observamos esta relación. No hay estudios en la literatura previa que analicen los efectos de la mutación de *BRAF* sobre la SG en tumores distales de colon. Debido a la baja frecuencia de la mutación V600E en los CCR distales no hay trabajos que obtengan resultados para la SG en esta localización.

La hipótesis de nuestro grupo se basa en que no es la mutación en sí la que confiere mal pronóstico sino que la mutación presenta diferentes efectos dependiendo del tipo de vía genética en la que se produzca.

Los tumores que se desarrollan a partir de la vía genética MSI presentan mejor pronóstico que los tumores MSS. Existe un subgrupo de carcinomas dentro de esta vía que presentan, además, alteraciones del gen *BRAF*, lo cual les confiere una peor evolución dentro de la ventaja que supone tener MSI.²²⁸ Esta hipótesis debería ser confirmada con un estudio de mayor tamaño muestral, debido a la baja frecuencia de mutaciones en el gen *BRAF* en el CCR.

El modelo de Volgestein caracterizó la carcinogénesis como un proceso lineal en el que alteraciones específicas se asociaban con la evolución secuencial de la neoplasia de colon. En este modelo, la inactivación del gen *APC* daba lugar a la aparición del adenoma inicial desde la mucosa normal, las mutaciones en *KRAS* se asociaban con el crecimiento del adenoma, las alteraciones en el cromosoma 18q se relacionaban con el crecimiento y la progresión y la inactivación de *P53* mediaba la transición hacia el carcinoma.¹⁸⁴ Los datos recientes aceptan que una alteración predispone a la siguiente,

pero no siempre este modelo lineal es el más apropiado ni el único para definir las vías de la carcinogénesis. Los modelos actuales proponen diferentes vías de progresión tumoral, que además pueden estar presentes en un mismo tumor.¹⁸⁸ Parece que el CCR se caracteriza mejor por 3 vías paralelas, cada una asociada a diferentes alteraciones genéticas y a precursores tisulares diferenciados.^{188,280,281}

La primera vía es la de CIN, que se produce a través de la secuencia adenoma carcinoma y está presente en el 85% de los CCR esporádicos. Se caracteriza por mutaciones en oncogenes y genes supresores, siendo la alteración más frecuente en esta vía la del gen *APC* seguida de mutaciones en *β-catenina*, en *P53* y LOH.^{188,280,281}

La segunda vía es la de MSI, que aparece en el 15-20% de los CCR y no presentan CIN. Se caracteriza por la pérdida de expresión de los genes MMR que da lugar a una acumulación de mutaciones en diversos puntos del genoma.^{188,280,281}

La tercera vía se caracteriza por la presencia de alteraciones epigenéticas que dan lugar al CIMP, en la que el mejor marcador es la hipermetilación de *hMLH1*, seguida de la MSI-H y las mutaciones en *BRAF*. En esta vía se pueden apreciar 2 subgrupos con diferencias en el grado de metilación pero con preferencia de localización proximal en ambos casos. La primera, denominada CIMP-H, tiene altos niveles de metilación, MSI y mutaciones en *BRAF*, mejor pronóstico y los tumores se forman a partir de adenomas serrados. La segunda, CIMP-L, tiene menos metilación que la anterior y se caracteriza por mutaciones en *KRAS*. Estos tumores se forman a partir de adenomas vellosos.^{188,280,282,285}

La vía del CIMP explica la hipermetilación asociada con *hMLH1* y otros genes supresores, y es la posible responsable de la MSI que acumula mutaciones en oncogenes y genes supresores.²⁸⁴ La inhibición de los MMR genera el fenotipo mutador que provoca mutaciones oncogénicas.²⁸⁵ Si la CIMP causa la inhibición de MMR, es por tanto la iniciadora del fenotipo mutador que da lugar al tumor.²⁸⁴

Shen y cols. proponen una explicación para las dos vías de CIMP. La ruta en la que aparece implicado *BRAF* puede iniciarse por eventos que activan metilasas o bien inactivan la protección del ADN a las metilasas lo que provoca un aumento considerable de la metilación de genes supresores. En el caso de la ruta en la que la CIMP se asocia con *KRAS* la explicación más plausible es por exposición ambiental a factores que favorecen la metilación pero no de manera tan extensa como en la ruta anterior, esto puede ocurrir en casos de inflamación crónica o daño tisular.²⁸⁰

Un marcador presente en el análisis de CIMP desde que se definió este concepto es el gen *P16*,¹⁹¹ ya que una de las alteraciones más frecuentes de este gen es la hipermetilación génica. La frecuencia de metilación de *P16* obtenida en este trabajo se encuentra en el rango de las frecuencias descritas en la literatura. Los datos sobre la metilación de *P16* en CCR son muy variables en los diferentes trabajos, con un rango entre 18% y 70%.^{261,265,286-292} Las diferencias en la metodología pueden ser una explicación a la diversidad de resultados. Sin embargo estas discrepancias también pueden ser atribuidas a diferencias étnicas causadas por variaciones genéticas o dietéticas o pueden estar relacionadas con las diferencias entre las cohortes estudiadas.²⁹³

La tecnología empleada en este estudio, la qMSP, permite obtener resultados cuantitativos y una mayor sensibilidad, incluso en muestras con cantidades reducidas de ADN, esta técnica es capaz de detectar la metilación presente en el 0,1% de las citosinas en una región conocida de islas CpG.²⁹⁴

En la literatura previa existen discrepancias en cuanto a la relación de la metilación de *P16* con las variables clínico-patológicas. Aunque algunos autores no encuentran asociación de *P16* con ninguna de las variables clínicas del tumor como el estadio, la histología o el grado,^{261,295,296} otros sí observan relaciones significativas: con estadio de Dukes avanzado, invasión linfática, mayor edad, sexo femenino, localización proximal del tumor, bajo grado de diferenciación e histología mucinosa.^{239,291,297-299} La metilación del promotor de *P16* en nuestra cohorte se relacionó con los tumores pobremente diferenciados y con localización proximal.

Las características clínico-patológicas de los tumores *P16* son también características del grupo de tumores en los que aparece implicada la vía MSI. El estado de MSI podría estar implicado en las diferencias en la frecuencia de metilación en función de la localización del tumor. Algunos autores han descrito previamente un aumento de metilación en tumores con MSI-H, que se localizan con elevada frecuencia en tumores proximales.^{191,297,300,301} La pérdida de función de *P16*, frecuentemente asociada a la metilación del promotor, está relacionada con la pobre diferenciación en otras patologías.³⁰¹⁻³⁰³ Esta ausencia de expresión provoca la desregulación del ciclo celular y favorece el proceso de dediferenciación.

La relación de la metilación con la MSI y más concretamente con la MSI-H ya ha sido descrita por otros autores, el trabajo de Psofaki y cols. observan metilación simultanea de *P16*, *hMLH1* y de la metiltransferasa *MGMT* en todos los CCR con MSI-H.²⁹² Muchos autores observan que el 70-80% de los tumores con MSI muestran silenciamiento epigenético de los MMR.^{212,213} En este trabajo la relación entre la metilación de *P16* y MSI queda claramente establecida, ya que el 79,5% de los tumores metilados son también MSI mientras que solo el 20% de los MSS presentaban la alteración.

El perfil de metilación de la célula y la metilación específica del gen *P16* han sido asociados con la edad, pero en nuestra cohorte, esta relación aparece solo como tendencia.^{301,304}

Sin embargo, no se observa relación entre la metilación de los dos genes estudiados, no hay asociación entre la metilación de los promotores de *P16* y de *hMLH1*. El grupo de Xiong tampoco observa esta relación aunque si encuentra correlación positiva entre la metilación del exón 2 de *P16* y *hMLH1*.³⁰⁵ Esta falta de asociación puede deberse a las diferencias temporales en la aparición de la metilación de *P16* y de *hMLH1* en la progresión del tumor. La metilación del promotor de *hMLH1* muestra frecuencias similares en adenomas tubulares, vellosos y CCR, lo que sugiere que es un evento de aparición temprana. La metilación del promotor de *P16* muestra un aumento significativo de frecuencia entre los adenomas tubulares y los vellosos lo que se correlaciona con la progresión tumoral.²⁹²

En cuanto a la supervivencia y a la evolución de la enfermedad, *P16* se relaciona en diversas publicaciones con metástasis locorregionales o a distancia y en los análisis multivariantes se presenta como predictor independiente de SG y SLE reducidas.^{240,242} El estado de metilación de *P16* es idéntico en el tumor colorrectal y en su metástasis hepática, parece que la metilación del promotor de *P16* está asociada con la inflamación primaria.²⁶¹

Algunos estudios analizan la relación de la metilación de *P16* con la supervivencia de los pacientes con CCR.^{240,295,299,301} En los estudios que analizan pronóstico es importante trabajar con poblaciones homogéneas y con un seguimiento prolongado para aumentar el valor de la información obtenida (la mediana de seguimiento en nuestro estudio fue de 92 meses). Aunque la metilación de *P16* no se relacionó con pronóstico en algunos trabajos, otros autores sí asociaron la presencia de metilación de *P16* con la reducción en la SG.^{240,295,301} En este trabajo no se detectó un efecto significativo de *P16* en el pronóstico. Sin embargo, cuando se realizó el análisis multivariable, se observó un efecto negativo en la SG que no pudo ser demostrado debido al tamaño poblacional. Shima y cols. demostraron en su análisis multivariable la asociación de la presencia de metilación en *P16* con una disminución de la SG.^{240,301}

No se encontraron diferencias en la SLE en función del estado de metilación de *P16*. Algunos han observado menor SLE asociada a metilación.²⁴⁰ Sin embargo, en el grupo de tumores pobremente diferenciados (grado III), la presencia de *P16* mostró efecto protector en la SLE ya que ninguno de los pacientes de este grupo con metilación recidivó. La influencia de *P16* en este subgrupo de pacientes no ha sido analizada por

otros autores aunque el efecto protector de *P16* en el pronóstico había sido descrito previamente en tumores gástricos.³⁰⁶

La mayoría de los trabajos actuales no analiza la metilación de *P16* individualmente, si no que abordan el estudio de la metilación de diversos genes en el CCR para profundizar y comprender el fenotipo CIMP.^{206,263,276,289,297,301,307-313}

La metilación en un solo locus pocas veces altera el fenotipo o el comportamiento del tumor. Este hecho queda demostrado en el estudio de Hawkins y cols. en el que tras analizar por separado 5 genes encuentran similitudes en el fenotipo de los tumores con alguno de estos genes metilados. Con estos datos demuestran indirectamente que la metilación de un locus individual más que ser el centro del desarrollo del tumor, refleja con mayor probabilidad el proceso de la metilación de islas CpG.²⁹⁷ Así, la metilación progresiva de islas CpG puede servir como biomarcador de un proceso global de metilación.

Ante estos datos, y para dar mayor validez al estudio de la metilación, se incluyó en este trabajo la metilación de otro gen, *hMLH1*, estudiada previamente por el mismo grupo de investigación y en el mismo grupo de pacientes. Con la inclusión de la metilación de la región promotora de *hMLH1* y la de *P16* se generó una nueva variable denominada MET2. La metilación de MET2 se considera cuando se produce la metilación simultánea de ambos genes.

Los patrones de metilación de *P16* y de *hMLH1* no son iguales en la progresión del CCR.²⁹² Cuando se analizan en el CCR los dos genes en conjunto podemos estudiar aquellos tumores que han evolucionado con un aumento de metilación génica. Varios autores defienden el aumento del número de loci metilados y de la frecuencia de metilación con la progresión tumoral,^{263,292} por lo que su análisis en conjunto nos muestra un subgrupo de tumores con características diferentes. Solo existen dos estudios publicados en los que se analice la metilación simultánea de estos dos genes en CCR.^{277,292}

La frecuencia de la metilación MET2 aumenta en el subgrupo de MSI^{277,292} con respecto a la población de CCR. Psofaki y cols. obtienen metilación simultánea de *P16* y *hMLH1* en el 60% de los CCR estudiados, y en el subgrupo de los MSI esta frecuencia aumenta hasta el 88% de los casos, sin embargo la población de CCR está formada solo por 20 pacientes y esto puede hacer que los datos no sean comparables.²⁹² En el estudio de Miladi-Abdennadher y cols. encontraron un 25% de MET2 en los CCR estudiados y un 36% en el grupo de los MSI, que es similar a las frecuencias observadas en este trabajo.²⁷⁷

Las características clínico-patológicas con las que se correlacionan los tumores MET2 dentro del grupo de MSI, mayor edad, localización proximal y pobre diferenciación, así como la relación con la mutación de *BRAF*, son también características de CIMP-H.^{280,298,308,310} Aunque en este estudio solo se aborde la metilación de 2 de los genes que se incluyen en el fenotipo metilador, se aprecian similitudes entre el grupo de tumores con metilación MET2 y los tumores que presentan

CIMP-H. MET2 ocurre como parte de CIMP-H, por lo que gran parte de estos tumores positivos para MET2 presentaran también CIMP-H.

En el análisis pronóstico de la MET2 se debe destacar que el trabajo de Miladi-Abdennadher y cols. no obtiene resultados significativos en la SG para la variable MET2 y que Psofaki y cols. no realizan análisis de supervivencia en su estudio. Por este motivo la comparativa de nuestros resultados en cuanto a la supervivencia se realizará con los estudios de CIMP que incluyan nuestros marcadores en su panel de metilación^{208,263,280,297,299,307-310,312-315} y que a pesar de la mayor precisión que estos ofrecen por incluir más marcadores de metilación, nuestros datos se encontrarán cercanos a los suyos ya que se ha demostrado que tanto *P16* como *hMLH1* tienen una especificidad mayor del 80% en la predicción del estado CIMP y CIMP-H respectivamente.³¹⁶

Los resultados sobre el significado pronóstico de CIMP parecen ser controvertidos, hay diversas publicaciones que observan resultados contrarios.^{241,299,316} Estudios como los de Dhalin y cols. y Barault y cols. no encuentran diferencias en la SG en el grupo de CIMP-H,^{308,310} pero si obtienen peor pronóstico de CIMP-L en el grupo de tumores MSS.³¹⁰

Atendiendo al estado de la MSI, hay trabajos que observan un efecto adverso de CIMP en la SG de pacientes con tumores MSS^{241,299,316} y otros que asocian CIMP-H en tumores MSI con un mejor pronóstico.^{260,263,297,313,315,316}

En nuestro grupo de tumores MET2, en el análisis univariable de la SG, los tumores con localización proximal no tienen efecto en el pronóstico, sin embargo, en el análisis multivariable la variable MET2 se comporta como factor independiente de mejor pronóstico en estos tumores.

En los tumores con localización distal, la variable MET2 actúa de forma negativa en el análisis univariable y en el multivariable siendo un factor independiente de mal pronóstico. El único tumor con esta localización muere a causa del tumor, esto podría indicar la agresividad de esta alteración génica en la localización distal, sin embargo el tamaño muestral de este grupo es muy bajo para poder confirmar esta hipótesis y no hay ningún dato en los trabajos publicados que tengan estos mismos resultados.

Como ya se ha comentado, existen diferencias embriológicas, histológicas, fisiológicas y bioquímicas entre el colon proximal y el distal.^{307,313} Se han encontrado más de 1000 genes con expresión diferencial en ambas localizaciones,³⁰⁷ por lo que es razonable considerar que los cánceres localizados en los diferentes tramos colónicos puedan tener diferencias y que las mismas alteraciones genéticas les confieran agresividad diferenciada, así, en el colon distal el fenotipo MET2 tiene un efecto negativo en el pronóstico que no aparece en la localización proximal.

Ogino y cols. son los únicos que observan un efecto predictor independiente de mejor SG en CIMP-H ajustado por *BRAF*. La mutación en *BRAF* se asocia con peor supervivencia pero el CIMP-H elimina este efecto adverso de la mutación que parece

estar limitado a los tumores no CIMP-H.^{228,263} En este trabajo el 90% de los tumores CIMP-H tienen localización proximal por lo que podría asemejarse a nuestros resultados de mejor pronóstico en los CCR proximales.

Las diferencias encontradas en la literatura publicada sobre la supervivencia asociada a CIMP pueden ser el resultado de diferencias en la cohorte de pacientes, en el tipo y número de marcadores de metilación, en las variables incluidas en los análisis estadísticos y en los modelos de análisis multivariantes. En nuestro estudio a pesar de tener pocos marcadores de metilación si que observamos el potencial predictor de MET2 aunque solo en el análisis estratificado. Es importante destacar que cuantos más marcadores de metilación se incluyan en los estudios, más potencial pronóstico se le da al CIMP. También es de gran importancia elegir correctamente los marcadores a estudiar.

En el análisis de la SLE la variable MET2 tiene un efecto protector fuerte, ya que no recidiva ninguno de los pacientes con este tipo de metilación. Jover y cols. observan este efecto protector en los estadios II y III de CCR, sin embargo, en la población general de CCR el estado de CIMP no afecta a la SLE.³¹² Nuestros datos proponen a la variable MET2 como predictor independiente de SLE, aunque como no recidiva ningún paciente no se pueden realizar los correspondientes análisis matemáticos para determinar el HR. El tiempo de seguimiento de los pacientes en este trabajo es mucho más elevado en que la mayoría de los estudios publicados sin embargo, el tamaño muestral de la población de MET2 es relativamente bajo para poder analizar el impacto pronóstico.

En el análisis estratificado este efecto protector se mantiene en los tumores de localización proximal donde la SLE es del 100%. En la literatura encontramos datos contrarios a estos aunque solo referidos a los estadios III de CCR, que presentan mayor recurrencia de la enfermedad asociada a CIMP en la localización proximal.³⁰⁷ Ahn y cols. proponen que puede existir una carcinogénesis específica de sitio o diferencias en el origen celular que pueden explicar esta variación en la metilación del ADN.³⁰⁷

La posible diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por Ahn y cols. pueden deberse a las diferencias en la cohorte analizada. Esta población solo comprende estadios III de CCR, y es posible que otros marcadores moleculares asociados a este estadio tengan un efecto dominante en la recidiva y esto anule el efecto de las diferencias dadas por la metilación en el pronóstico. Así, las deleciones en el cromosoma 18 se asocian con recidivas en estadio III de CCR y son más comunes en localización proximal y CIMP negativo.³⁰⁷

Otra posible causa de los resultados opuestos en el efecto pronóstico es el uso del gen *WNT5a* como marcador para la caracterización de CIMP que tiene un comportamiento agresivo cuando está alterado.³¹⁷ La expresión de *WNT5a* se ha identificado en diversos estudios como marcador favorable en el pronóstico de CCR ya que puede actuar como supresor de tumores en CCR.³¹⁷⁻³¹⁹ La metilación de *WNT5a* se asocia con tumores de localización proximal, MSI, *hMLH1* metilado y *BRAF* mutado³¹⁸ por lo que es factible pensar que sea un marcador útil en el CIMP. *WNT5a* aparece inactivado por metilación en el 18-54% de los tumores estudiados^{307,318,319} sin embargo, en la literatura revisada, *WNT5a* no es un marcador típicamente utilizado en la

caracterización del fenotipo metilador. En el trabajo de Ahn y cols., este gen es analizado para determinar el CIMP, y aparece con una frecuencia mayor del 50% en los tumores analizados³⁰⁷ lo que puede afectar negativamente al pronóstico del CCR y con un efecto lo suficientemente fuerte en la supervivencia como para generar diferencias con nuestros resultados.

La capacidad protectora de MET2 en la SLE también tiende a ejercer un efecto dominante sobre la mutación de *BRAF*. La variable MET2 clasifica en los MSI los tumores con mutación en el gen *BRAF* en dos grupos con diferente pronóstico. El subgrupo de los metilados en el que no recidiva ningún paciente y el de los metilados en el que recidivan el 33%.

La mayoría de las poblaciones tienen pocos tumores con *BRAF* alterado y hay pocos estudios que analicen la SLE en los tumores CIMP. Como ya se ha comentado, *BRAF* tiene un efecto adverso en la supervivencia, muchos autores ven este efecto solo en los tumores que no son CIMP-H.²⁶³ El efecto en la SLE de *BRAF* es menos potente que el de MET2, y aunque pertenezcan a la misma vía carcinogénica *BRAF* no es un parámetro útil para analizar la supervivencia cuando contamos con los datos de MET2. Los test de análisis de CIMP y *BRAF* se utilizan principalmente para diferenciar la HNPCC de pacientes con MSI-H de los CCR esporádicos.^{255,263}

El mayor beneficio de la profundización en el conocimiento de las múltiples vías del cáncer de colon se relaciona con individualización en la aplicación de las terapias. Esta ampliamente aceptado que hay una respuesta diferente de los pacientes al 5-FU

según el estado de la MSI. Los MSS obtienen beneficio del tratamiento con 5-FU observándose una SLE mayor que en los no tratados y que no se diferencia de la de los MSI tratados. Sin embargo los pacientes MSI no tratados presentan mejor SLE que los MSS, cuando no se aplica tratamiento adyuvante, y que los MSI tratados, es decir, los MSI no se benefician del tratamiento con 5-FU.^{164,165}

En el CCR, el 50-55% de los pacientes en estadio III presentan recidiva a los 5 años de seguimiento. La quimioterapia adyuvante aumenta la SG en un 15-20%, sin embargo, la mayoría de los pacientes ya están libres de enfermedad tras la cirugía, por lo que reciben de manera innecesaria un tratamiento que tiene toxicidad. La terapia adyuvante basada en fluoropirimidinas es el tratamiento estándar para los pacientes de CCR en estadio III, aunque continúa en controversia para los pacientes en estadio II. Algunos estudios observan un modesto beneficio del 2-4% en la SLE para las terapias con 5-FU en pacientes con CCR en estadios II.^{320,321} El trabajo de Sargent y cols. analiza el efecto del tratamiento con 5-FU según el estado de la MSI en pacientes de CCR en estadios II y III y el único subgrupo que se beneficia del tratamiento son los estadios III que son MSS, obteniéndose un aumento significativo de la SLE con respecto a los pacientes tratados solo con cirugía.¹⁶⁴

En estadios III, la mutación en *BRAF* se asocia con un aumento en la mortalidad en pacientes tratados con 5-FU y Leucovorina en comparación con los mutados tratados con Irinotecan/5-FU/Leucovorina (IFL) y con los no mutados que reciben cualquiera de los dos tratamientos. El tratamiento con IFL atenúa el efecto de la mutación en el pronóstico.^{162,228} Esta sensibilidad de las células con la mutación V600E al Irinotecan

puede estar asociado al aumento de metilación asociada a *BRAF*, ya que se ha observado una gran sensibilidad a la camptotecina en células con altos niveles de metilación.³²²

Si se combinan la MSI con la mutación V600E, los pacientes en estadios III que presentan *BRAF* mutado y MSS o *BRAF* no mutado y MSI-H se benefician del tratamiento IFL y presentan mayor SG y SLE que las otras dos combinaciones de estos marcadores.²²⁸

Jover y cols. sugieren que el beneficio viene dado por la metilación asociada a CIMP no por las alteraciones en los MMR que dan lugar al fenotipo MSI, y esto lo demuestran Van Rijnsoever y cols. obteniendo resultados positivos independientes de la MSI de mejor pronóstico para los CIMP positivos tratados con 5-FU.^{312,314}

En los estadios II y III el estado de CIMP influye en la respuesta al tratamiento con 5-FU. Los pacientes tratados con 5-FU adyuvante tienen mayor SLE pero el efecto depende del estado de CIMP, solamente se benefician de este efecto los CIMP negativos. En los estadios II y III que no reciben el tratamiento los CIMP positivos tienen mejor SLE que los negativos. Jover y cols. observan una interacción independiente significativa para la supervivencia entre el estado de CIMP y la quimioterapia, demostrando que CIMP influye en la respuesta a este tratamiento.³¹² Los tumores CIMP positivos y los CIMP negativos son genéticamente diferentes,³²³ por lo que el metabolismo por el que se procesa 5-FU también puede ser diferente.

Van Rijnsoever y cols., obtienen datos contrarios a los de Jover y cols. Al analizar la población de CCR observa que los tumores CIMP presentan peor pronóstico en relación con los no CIMP. Cuando estudian los pacientes tratados con 5-FU, en el grupo de los CIMP se observa una tendencia de mejor SG que en los no CIMP. Además, en el subgrupo de pacientes CIMP, los que reciben tratamiento con 5-FU tienen una mejor SG significativa que los que no la reciben. Si analizan solamente los CCR en estadio III con CIMP y sin tratamiento quimioterápico, estos tienen peor pronóstico que los CIMP tratados con 5-FU, además este efecto es independiente de la MSI. Este efecto no se ve en los CIMP negativos. La hipótesis planteada por este grupo propone una interacción entre CIMP y la quimioterapia, los tumores CIMP muestran mayor quimiosensibilidad posiblemente porque el silenciamiento asociado a su fenotipo inactiva genes necesarios para la supervivencia de la célula en presencia de 5-FU.³¹⁴

Hay autores que ven resistencia a la quimioterapia en los CIMP positivos^{241,316} y otros no observan esta resistencia.³¹⁴ Todas estas diferencias pueden deberse a las diferentes frecuencias de MSI y *BRAF* en las diferentes cohortes analizadas, en las técnicas moleculares empleadas, en el número de loci incluidos en la variable CIMP y en el tipo de marcadores de metilación usados.

Los tratamientos de quimioterapia no se están usando de manera diferencial según el estado tumoral de CIMP, MSI o *BRAF*. El hecho de que los estudios sean prospectivos y que algunas variables genéticas tengan baja frecuencia limita considerablemente la capacidad de obtener resultados concluyentes.

Las clasificaciones basadas en MSI y en CIMP son muy importantes porque estos dos eventos reflejan alteraciones genéticas y epigenéticas globales en las células tumorales. Los resultados analizados dan gran validez al análisis de MET2, y concuerdan con las características que definen CIMP-H en la literatura publicada. El análisis de estos dos genes conjuntamente se ajusta a la definición propuesta para CIMP-H.

En este trabajo la variable definida por la metilación de *P16* y *hMLH1*, marca claras diferencias con respecto a los no metilados y nos genera un grupo específico de mejor SLE independiente de la mutación de *BRAF*. A pesar de esto, no existe ningún trabajo publicado en el que se analicen las alteraciones epigenéticas de estos dos genes de manera conjunta en la SLE.

En conclusión, este estudio demuestra el valor pronóstico de MET2, independientemente de otras variables clínico-patológicas significativas en su pronóstico y obtiene unos resultados mucho más concluyentes que los publicados para CIMP en el análisis de la SLE. De aquí se puede deducir el probable beneficio que esta información adicional puede aportar en su seguimiento y terapia.

CONCLUSIONES

1. La frecuencia de la mutación V600E del gen *BRAF* en nuestra cohorte de pacientes con CCR esporádico es de 4%. Esta alteración es más frecuente en tumores localizados en colon proximal.
2. La mutación en el gen *BRAF* es más frecuente en los tumores que presentan MSI-H, metilación en *P16*, metilación en *hMLH1* y metilación MET2.
3. La frecuencia de la metilación de *P16* en esta cohorte de pacientes con CCR esporádico es de 24,2%. La metilación aparece más frecuentemente en tumores localizados en colon proximal y en los tumores menos diferenciados.
4. La metilación de *P16* es significativamente más frecuente en los tumores que presentaban MSI-H y MSI-L.
5. La frecuencia de la metilación MET2 en nuestra cohorte de pacientes con CCR esporádico es de 33,3%. Esta metilación es más frecuente en los tumores de localización proximal y en los tumores menos diferenciados.
6. La mutación V600E es un factor de peor pronóstico en la SG de los pacientes con tumores de localización distal.
7. La presencia de la metilación de *P16* supone un incremento del riesgo de fallecer en los pacientes con tumores moderadamente diferenciados.
8. La metilación MET2 es un factor de peor pronóstico en la SG de los pacientes con tumores de localización distal.
9. En los tumores de colon proximal, la variable MET2 se comporta como factor pronóstico independiente en la SG.

10. La metilación de *P16* es un factor de mejor pronóstico en la SLE de los pacientes con tumores menos diferenciados.
11. Los tumores con metilación MET2 presentan una reducción en el riesgo de recaer.
12. La presencia de la metilación MET2 presenta un efecto reductor en el riesgo de recaer en el grupo de tumores con localización proximal.
13. La mutación V600E presenta un efecto reductor en el riesgo de recaer en el grupo de tumores con metilación MET2.
14. La variable MET2 tiene un efecto protector fuerte independiente en la SLE.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization The global burden of disease: 2004 Update. WHO; 2008.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. International Agency for Research on Cancer 2001.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005;55:74-108.
5. World Health organization. International agency for research on Cancer: World Cancer Report 2008. WHO; 2008.
6. Fearon ER. Molecular Biology of Gastrointestinal Cancers. En: Cancer Principles and Practice of Oncology. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). 6ª edición Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
7. World Health Organization. National cancer control programmes: policies and managerial guidelines. 2ª edición. WHO; 2002.
8. Lopez Albente, M Pollan, N Aragonés, B Pérez Gómez, V Hernandez Barrena, V Lope, et al. Situacion del cáncer en España: incidencia. Anales Sistema Sanitario de Navarra. 2004;27.
9. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerto. Año 2008. Nota de prensa marzo 2010.

10. Ministerio de Sanidad y Política Social. España. Instituto de Información Sanitaria. Mortalidad por causa de muerte.
11. Martinez Garcia C, Peris Bonet R, Sanchez Perez MJ. Epidemiología descriptiva del cáncer en España. Capítulo 1. En: Tercer libro blanco oncología en España. Ergon 2002.
12. Skinner SA, O'Brien PE. The microvascular structure of the normal colon in rats and humans, J.Surg.Res. 1996;61:482-490.
13. Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH, Read TE, Colon, Rectum, and Anus. En: Principles of Surgery. Schwartz SI. 7^a edición. The McGraw-Hill Companies, Inc. 1999.
14. Potter, JD. Colorectal cancer: Molecules and population. J Nat Cancer Inst 1999; 91: 916-932.
15. Kinzler KW, and Vogelstein B. Colorectal tumors. En: The Genetic Basis of Human Cancer. Vogelstein, B., Kinzler, K.W., eds. 2^a edición. McGraw-Hill, New York. 2002.
16. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell, Bioessays. 2002 24:91-98.
17. Allen BA, Terdiman JP. Hereditary polyposis síndromes and hereditary non-polyposis colorectal cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003;2:237-258.
18. Zuber M, Harder F. Surgical treatment Benign tumors of the colon and rectum Department of Surgery: Surgical Treatment, University of Basel, Switzerland. 2001.

19. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 1990;98:371–379.
20. Crawford JM. The gastrointestinal tract. En: *Pathologic basis of disease*. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V (eds). WB Saunders Company, Philadelphia. Crawford 1994.
21. Odze RD, Brien T, Brown CA, Hartman CJ, Wellman A, Fogt F et al. Molecular alterations in chronic ulcerative colitis associated and sporadic and sporadic hyperplastic polyps: A comparative analysis. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1235-1242.
22. Nakamura S, Kino I, Akagi T. Inflammatory myoglandular polyps of the colon and rectum. A clinicopathological study of 32 pedunculated polyps distinct from other types of polyps. *Am J Surg Pathol*. 1992;16:772-779.
23. Wirtzfeld DA, Petrelli Nj, Rodriguez-Bigas MA. Hamartomatous polyposis syndromes. Molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Ann Surg Oncol*. 2001;8:319-327.
24. Markowitz AJ, Winawer SJ. Management of Colorectal Polyps. *CA Cancer J Clin*. 1997;47:93-112.
25. Mayer RJ. Tumores de intestino delgado y grueso. En: *Principios de Medicina Interna*. Harrison TR. 13ª edición. Interamericana Mcgrawhil. 1994.
26. Corman ML. Less common tumors and tumorlike lesions of the colon, rectum and anus. En: *Colon & Rectal Surgery*. Corman ML (ed). Lippincott-Raven. New York. 1998.

27. Rodrigo L, Riestra S. Dieta y cáncer de colon. *Rev. esp. enferm. dig.* 2007;99:183-189.
28. Bond JH. Update on the detection, management and follow-up of colorectal polyps, *Practical Gastroenterol.* 1997;21:15-29.
29. Gomez C, Patkan M, Hurvitz M, Dematteis F. Leiomioma de ciego. Presentación de un caso. *Rev. Asoc Coloproct del Sur.* 2007.
30. Varela G, Cervera JA, Fernandez G, Rodriguez NA, Flores J, Robles C. Hemangioma cavernoso de colon. Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev Gastroenterol Mex.* 2004;69:94-99.
31. Candanedo G, Luna P. Linfangioma quístico del mesenterio. Analisis clínico, radiológico y morfológico. *Rev Gastroenterol Mex.* 2000;65:6-10.
32. Yañez R, Parada X, da Venecia M, Valdivia L, Gamboa C, Martinez J. Linfangioma Mesententerico multiquistico como causa de vólvulo intestinal. *Rev chilena de Cirugia.* 2009;61:285-289.
33. Hamilton SR, Rubio CA, Vogelstein B. Carcinoma of the colon and rectum. En: *World Health Organization classification of tumours. Tumours of the digestive system.* Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. Lyon, France: IARC Press; 2000.
34. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens removed from patients with colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1016–1025.
35. Secco GB, Fardelli R, Campora E, Lapertosa G, Gentile R, Zoli S, et al. Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology.* 1994;51:30-34.

36. Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, O'Donoghue DP. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg.* 1996;83:46–50.
37. Nissan A, Guillem JG, Paty PB, Wong WD, Cohen AM. Signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: a matched control study. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1176.
38. Sasaki S, Masaki T, Umetani N, Futakawa N, Ando H, Muto T. Characteristics in primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum, from clinicopathological observations. *Jpn J Clin Oncol.* 1998;28:202-206.
39. Schneider TA, Birkett DH, Vernava AM. Primary adenosquamous and squamous cell carcinoma of the colon and rectum. *Int J Colorectal Dis.* 1992;7:144–147.
40. Cerezo L, Alvarez M, Edwards O, Price G. Adenosquamous carcinoma of the colon. *Dis Colon Rectum.* 1985;28:597–603.
41. Thomas RM, Sobin LH. Gastrointestinal cancer. *Cancer.* 1995;75:154-170.
42. Vilallonga R, Espín Basany E, López Cano M, Landolfi S y Armengol Carrasco M. Neuroendocrine carcinomas of the colon and rectum. A unit's experience over six years. *Rev. esp. enferm. dig.* 2008;100.
43. Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, et al. p53 and Kras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17:1375-1381.
44. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J. Cancer incidence in five continents. IARC Sci Publ 1992. Oxford: Oxford University Press.
45. Doll R, Peto R. The causes of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1981;66:1191-1308.

46. Willett WC. Diet, nutrition and avoidable cancer. *Environ Health Perspect* 1995;103:165-170.
47. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003;361:1496–501.
48. Young-In K. American Gastroenterological Association medical position statement: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *American College of Gastroenterology. Gastroenterology* 2000;118:1233-1234.
49. Alberts DS, Martínez ME, Roe DJ, Guillén-Rodríguez JM, Marshall JR, Van Leeuwen JB, et al. Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. *Phoenix Colon Cancer Prevention Physician's Network. N Engl J Med*, 2000;342:1156-1162.
50. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish and colorectal cancer risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:906-916.
51. Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal. Actualización 2009. Guía de práctica clínica. Barcelona: Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria, y Centro Cochrane Iberoamericano; 2009. Programa de Elaboración de Guías de Práctica Clínica en Enfermedades Digestivas, desde la Atención Primaria a la Especializada: Elsevier España.
52. Van Munster IP, Nagengast FM. The role of carbohydrate fermentation in colon cancer prevention. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1993;200:80-86.

53. Glinghammar B, Holmberg K, Rafter J. Effects of colonic lumeral components on AP-1 dependent gene transcription in cultured human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 1999;20:969.
54. Jarviven R, Kenekt P, Hakulinen T, Rissanen H, Heliovaara M. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. *Br J Cancer*. 2001;85:357-361.
55. Kushi L, Giovannucci E: Dietary fat and cancer. *Am J Med*. 2002;113:63-70.
56. Le Marchand L. Meat intake, metabolic genes and colorectal cancer. *IARC Sci Publ* 2002;156:481-485.
57. De Meester C, Gerber GB. The role of cooked food mutagens as posible etiological agents in human cancer: a critical appraisal of recent epidemiological investigations. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 1995;43:147.
58. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005;293:172-182.
59. Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk. *Int J cáncer* 2002;98:241-256.
60. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res*. 1994;54:2390-2397.
61. Castells A, Marzo M, Bellas B, Amador FJ, Lanas A, Mascort JJ, et al. Guía de práctica clínica en prevención del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol* 2004;27:573-634.
62. Järvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Aromaa A. Prospective study on milk products, calcium and cancers of the colon and rectum. *Eur J Clin Nutr*. 2001;55:1000-1007.

63. Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B. Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutr Cancer*. 2009;61:47-69.
64. Russo MW, Murray SC, Wurzelmann JL, Woosley JT, Sandler RS. Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas. *Nutr Cancer*. 1997;28:125-129.
65. Connelly-Frost A, Poole Ch, Satia JA, Kupper L, Millikan RC, Sandler RS. Selenium, Folate, and Colon Cancer. *Nutr Cancer*. 2009;61:165–178.
66. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*. 2000;130:129-132.
67. Kim YI, Baik HW, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Norton R, et al. Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective, randomized trial. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:184-195.
68. Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, et al. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *Br J Cancer*. 1999;79:1917.
69. Lashner BA, Provencher KS, Seidner DL, Knesebeck A, Brzezinski A. The effect of folic acid supplementation on the risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1997;112:29-32.
70. Burt RW, Winawer SJ, Bond JH, Levin B, Sandler RS. Preventing Colorectal Cancer: A Clinician's Guide. American Gastroenterological Association, 2004.
71. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Agents. Weight control and physical activity. *Handbooks of cancer prevention*, vol. 6. Lyon: IARC Press, 2002.

72. Bergstrom A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer*. 2001;91:421-430.
73. McTiernan A. Obesity and cancer: The risks, science, and potential management strategies. *Oncology*. 2005;19: 871-881.
74. Franceschi S, La V. Alcohol and the risk of cancers of the stomach and colorectum. *Dig Dis*. 1994;12:276.
75. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, Van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: A pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med*. 2004;140:603-613.
76. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:725-31.
77. Nagata C, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, Ohnuma T, Matsushita S. Cigarette smoking, alcohol use, and colorectal adenoma in Japanese men and women. *Dis Colon Rectum*. 1999;42:337.
78. Newcomb PA, Storer BE. Postmenopausal hormone use and risk of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1076.
79. Bosetti C, Bravi F, Negri E, La Vecchia C. Oral Contraceptives and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009;15:489-498.
80. Slattery ML, Potter JD, Curtin K, Edwards S, Ma K, Anderson K, et al. Estrogens Reduce and Withdrawal of Estrogens Increase Risk of Microsatellite Instability-positive Colon Cancer *Cancer Res*. 2001;61:126-130.

81. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med*. 1995;333:609-614.
82. Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA*. 1999;282:1254.
83. Foutch PG, Mai H, Pardy K, DiSario JA, Manne RK, Kerr D. Flexible sigmoidoscopy may be ineffective for secondary prevention of colorectal cancer in asymptomatic, average risk men. *Dig Dis Sci*. 1991;36:924.
84. Gordon PH, Nivatvongs S. Neoplasms of the colon, rectum and anus. Parte I. Second edition. 2007. Informa Healthcare USA, Inc.
85. Ahmadi A, Polyak S, Draganov PV. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: The search continues. *World J Gastroenterol*. 2009;7:15:61-66.
86. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:7-17.
87. Pinczowski D, Ekblom A, Baron J, Yuen J, Adami HO. Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology*. 1994;107:117-120.
88. Levin B. Inflammatory bowel disease and colon cancer. *Cáncer*. 1992;70:1313.
89. Eaden JA, Abrams KR, Myberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta analysis. *Gut*. 2001;48:526-535.

90. Taylor BA, Pemberton JH, Carpenter HA, Levin KE, Schroeder KW, Welling DR, et al. Dysplasia in chronic ulcerative colitis: implications for colonoscopic surveillance. *Dis Colon Rectum*. 1992;35:950.
91. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet*. 1990;336:357-359.
92. Schoen RE. Families at risk for colorectal cancer: risk assessment and genetic testing. *J Clin Gastroenterol*. 2000;31(2):114-120.
93. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*. 1996;78:1149-67.
94. National Cancer Institute. Cancer genetics Overview. Disponible en: <http://www.cancer.gov/cancerinfo/pdq/genetics/overview.html>.
95. Campbell WJ, Spence RA, Parks TG. Familial adenomatous polyposis. *Br J Surg*. 1994;81:1722-1733.
96. Church JM, McGannon E, Hull-Boiner S, Sivak MV, Van Stolk R, Jagelman DG, et al. Gastroduodenal polyps in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum*. 1992;35:1170-1173.
97. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). John Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 175100. 2003: World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
98. Bussey HJ. Familial Polyposis Coli: Family Studies, Histopathology, Differential Diagnosis, and Results of Treatment. Baltimore, Md: The Johns Hopkins University Press, 1975.
99. Herrera L, ed.: Familial Adenomatous Polyposis. New York, NY: Alan R. Liss Inc, 1990.

100. Rozen P, Samuel Z, Rabau M, Goldman G, Shomrat R, Legum C, et al. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Human Mut.* 1994;3:121-125.
101. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med.* 1995;332:839-847.
102. King JE, Dozois RR, Lindor NM, Alquist DA. Care of patients and their families with familial adenomatous polyposis. *May Clin Proc.* 2000;75:57-67.
103. Brensinger JD, Laken SJ, Luce MC, Powell SM, Vance GH, Ahnen DJ, et al. Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutation in the APC gene. *Gut.* 1998;43:548-552.
104. Giardiello FM, Brensinger JD, Luce MC, Petersen GM, Cayouette MC, Krush AJ et al. Phenotypic expression of disease in families that have mutations in the 5' region of the adenomatous polyposis coli gene. *Ann Intern Med.* 1997;126:514-519.
105. Lynch HT, Smyrk TC. Classification of familial adenomatous polyposis: a diagnostic nightmare. *Am J Hum Genet.* 1998;62:1288-1289.
106. Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, et al. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet.* 1998;62:1290-1301.
107. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med.* 2003;348:791-799.

108. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet*. 2003;362:39-41.
109. Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, Siberg K, Vogel M, Pagenstecher C, et al. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer*. 2006;119:807-814.
110. Lipton L, Tomlinson I. The multiple colorectal adenoma phenotype and MYH, a base excision repair gene. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2:633-638.
111. Kastrinos F, Syngal S. Recently identified colon cancer predispositions: MYH and MSH6 mutations. *Semin oncology*. 2007;34:418-424.
112. Tenesa A, Campbell H, Barnetson R, Porteous M, Dunlop M, Farrington SM.. Association of MUTYH and colorectal cancer. *Br J Cáncer*. 2006;95:239-242.
113. Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. En: Vogelstein B, Kinzler KW, eds.: *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York, NY: McGraw-Hill. 1998.
114. Lynch HT, Lanspa S, Smyrk T, Boman B, Watson P, Lynch J. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991;53:143-160.
115. Lynch HT, Lynch JF. Genetics of colorectal cancer. *Digestion*. 1998;59:481-92.
116. Hendriks YM, Wagner A, Morreau H, Menko F, Stormorken A, Quehenberger F, et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology*. 2004;127:17-25.

117. Broaddus RR, Lynch HT, Chen LM, Daniels MS, Conrad P, Munsell MF, et al. Pathologic features of endometrial carcinoma associated with HNPCC: a comparison with sporadic endometrial carcinoma. *Cáncer*. 2006;106:87-94.
118. Chen S, Wang W, Lee S, Nafa K, Lee J, Romans K, et al. Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA*. 2006;296:1479-1487.
119. Vasen RFA, Mecklin JP, Meera-Khan P, Lynch HT. International Collaborative Group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Dis Colon Rectum*. 1991;34:424.
120. Katballe N, Christensen M, Wikman FP, Orntoft TF, Laurberg S. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Danish colorectal cancer patients. *Gut*. 2002;50:43-51.
121. South CD, Hampel H, Comeras I, Westman JA, Frankel WL, de la Chapelle A.. The frequency of Muir-Torre syndrome among Lynch syndrome families. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:277-281.
122. Cannon-Albright LA, Skolnick MH, Bishop DT, Lee RG, Burt RW. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med*. 1988;319:533-537.
123. Wiesner GL, Daley D, Lewis S, Ticknor C, Platzer P, Lutterbaugh J, et al. A subset of familial colorectal neoplasia kindreds linked to chromosome 9q22.2-31.2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:12961-12965.
124. Gray-McGuire C, Guda K, Adrianto I, Lin CP, Natale L, Potter JD, et al. Confirmation of Linkage to and Localization of Familial Colon Cancer Risk Haplotype on Chromosome 9q22 *Cancer Res*. 2010;70:5409-5418.

125. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2006;42:216-227.
126. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:919-932.
127. Boudeau J, Kieloch A, Alessi DR, Stella A, Guanti G, Resta N. Functional analysis of LKB1/STK11 mutants and two aberrant isoforms found in Peutz-Jeghers Syndrome patients. *Hum Mutat*. 2003;21:172.
128. Lim W, Hearle N, Shah B, Murday V, Hodgson SV, Lucassen A, et al. Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *Br J Cancer*. 2003;89:308-313.
129. Amos CI, Keitheri-Cheteri MB, Sabripour M, Wei C, McGarrity TJ, Seldin MF, et al. Genotype-phenotype correlations in Peutz-Jeghers syndrome. *J. Med. Genet*. 2004;41:327-333.
130. Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1634-1640.
131. Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet*. 2001;28:184-187.
132. Zhou XP, Woodford-Richens K, Lehtonen R, Kurose K, Aldred M, Hampel H, et al. Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet*. 2001;69:704-711.

133. Brosens LA, van Hattem A, Hyland LM, Iacobuzio-Donahue C, Romans KE, Axilbund J, et al. Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. *Gut*. 2007;56:965-967.
134. Lockett MJ, Atkin WS. Hyperplastic polyposis: prevalence and cancer risk, *Gut*. 2001;48.
135. Jass J. Hyperplastic Polyposis. En: Hamilton SR, Aaltonen LA: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2000.
136. Chow E, Lipton L, Lynch E, D'Souza R, Aragona C, Hodgkin L, et al. Hyperplastic polyposis syndrome: phenotypic presentations and the role of MBD4 and MYH. *Gastroenterology*. 2006;131:30-39.
137. Hyman NH, Anderson P, Blasyk H. Hyperplastic polyposis and the risk of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:2101-2104.
138. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. (eds). *AJCC Cancer Staging Manual*. 7ª edición. New York: Springer-Verlag; 2009.
139. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol*. 2008;15:2388-2394.
140. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*. 2010;53:57-64.
141. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol*. 1932;35:323.
142. Kirkland JW, Docherty MD, Waugh JM. The role of the peritoneal reflection in

- the prognosis of carcinoma of the rectum and sigmoid colon. *Surg Gynecol Obstet.* 1949;88:326-331.
143. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 1954;139:846.
144. Turnbull RB, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technique on survival rates. *Ann Surg.* 1967;160:420-425.
145. UICC Committee on Clinical Stage Classification and Applied Statistics. Clinical Stage Classification and Presentation of Results, Malignant Tumors of the Breast and Larynx. Paris: International Union Against Cancer; 1958.
146. Beahrs OH, Carr DR, Rubin P, eds. Manual for Staging of Cancer. Chicago, IL: American Joint Committee on Cancer; 1977.
147. TNM Atlas. Illustrated Guide to the TNM/pTNM Classification of Malignant Tumors, 4^a edición. Berlín: Springer Verlag, 1997.
148. Compton CC. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. *Mod Pathol.* 2003;16:376–388.
149. Fujita S, Shimoda T, Yoshimura K, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Prospective evaluation of prognostic factors in patients with colorectal cancer undergoing curative resection. *Journal of Surgical Oncology.* 2003;84:127-131.
150. Nan KJ, Quin HX, Yang G. Prognostic factors in 165 elderly colorectal cancer patients. *World Journal Gastroenterology.* 2003;9:2207-2210.
151. Washington MK, Berlin J, Branton PA, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinomas of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:1182-1193.

152. Blenkinsopp W, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G, Fielding LP. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol*. 1981;34:509-513.
153. Law WL, Chu KW. Anterior resection for rectal cancer with mesorectal excision: a prospective evaluation of 622 patients. *Ann Surg*. 2004;240:260-268.
154. Cross SS, Bull AD, Smith JHF. Is there any justification for the routine examination of bowel resection margins in colorectal adenocarcinoma? *J Clin Pathol*. 1989;42:1040-1042.
155. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, van de Velde CJ, van Krieken JH. Pathology Review Committee; Cooperative Clinical Investigators. Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit. *Am J Surg Pathol*. 2002;26:350-357.
156. Grinnell RS. The grading and prognosis of carcinoma of the colon and rectum. *Cáncer*. 1950;3:641-652.
157. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124:979-994.
158. Compton CC, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors consensus conference: Colorectal Working Group. *Cáncer*. 2000;88:1739-1757.
159. Duffy MJ, Van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003;39:718-727.

160. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2001;6:1865-1878.
161. Turner RR, Li C, Compton CC. Newer pathologic assessment techniques for colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;15:6871-6876.
162. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol.* 2010;28:466-474.
163. Bertagnolli MM, Redston M, Compton CC, Niedzwiecki D, Mayer RJ, Goldberg RM et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: prospective evaluation of biomarkers for stages II and III colon cancer-a study of CALGB 9581 and 89803. *J Clin Oncol.* 2011;10:3153-3162.
164. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010;10:3219-3226.
165. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:247-257.
166. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical

- trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2011;8:103:863-875.
167. Brady HJ, Gil-Gómez G. Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:647-650.
168. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer.* 2001;85:692–696.
169. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417:949–954.
170. Farina-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Moerland E, Creemers GJ, Lemmens VE, Rutten HJ et al. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. *Ann Oncol.* 2010;21:2396-2402.
171. Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
172. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1996;5:1727-32.
173. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Shima K, Baba Y, Kirkner GJ et al. Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of heterozygosity: a cohort study of microsatellite stable colorectal cancers. *J Clin Oncol.* 2009;27:4591–4598.

174. Soussi T. The p53 tumor supresor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;910:121-137
175. Vidaurreta M, Maestro ML, Sanz-Casla MT, Rafael S, Veganzones S, de la Orden V, et al. Colorectal carcinoma prognosis can be predicted by alterations in gene p53 exons 5 and 8. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23:581-586.
176. Karlberg M, Ohrling K, Edler D, Hallstrom M, Ullen H, Ragnhmmar P. Prognostic and Predictive Value of Thymidylate Synthase Expression in Primary Colorectal Cáncer. *Anticancer Research.* 2010;30:645-652.
177. Ohrling K, Karlberg M, Edler D, Hallström M, Ragnhammar P.A Combined Analysis of Mismatch Repair Status and Thymidylate Synthase Expression in Stage II and III Colon Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2012 pii: S1533-0028(12)00144-2.
178. O'Brien MJ, O'Keane JC, Zauber A, Gottlieb LS, Winawer SJ. Precursors of colorectal carcinoma. Biopsy and biologic markers. *Cancer.* 1992;70:1317-1327.
179. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gouttlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med.* 1993;329:1977-1981.
180. Correa P. Epidemiology of polyps and cancer, in Morson BC (ed). *En: The Pathogenesis of Colorectal Cancer*, vol 10. Philadelphia, WB Saunders Co, 1978, 126-162.
181. Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med.* 1994;331:1694.

182. Hamilton SR. Pathology and biology of colorectal neoplasia. En: Young GP, Rozen P, Levin B, eds. Prevention and early detection of colorectal cancer. London: WB Saunders, 1996.
183. Murakanni R, Tsukuma H, Kanamori S, Imanishi K, Otani T, Nakanishi K, et al. Natural history of colorectal polyps and the effect of polypectomy on occurrence of subsequent cancer. *Int J Cancer*. 1990;46:159.
184. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-767.
185. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genetics*. 1993;9:138-141.
186. Hahn M, Saeger HD, Schackert HK. Hereditary colorectal cancer: clinical consequences of predictive molecular testing. *Int J Colorectal Dis*. 1999;14:184-193.
187. Mecklin JP, Peltomaki P. Genetic changes associated with colon tumor development. *Ann Chiru Gynaecol*. 2000;89:211-215.
188. Sweeney C, Boucher KM, Samowitz WS, Wolff RK, Albersten H, Curtin K, et al. Oncogenic Tree Model of Somatic Mutations and DNA methylation in colon tumors. *Gener, Chromosomes & Cáncer*. 2009;48:1.
189. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cáncer. *Cell*. 1996;87:159-170.
190. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cáncer. *Nat Rev Genet*. 2002;3:415-428.
191. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. *Poc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:710-715.

192. Nowak MA, Komarova ML, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih IM, Vogelstein B, et al. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *PNAS*. 2002;99.
193. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396:643-649.
194. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis than persists after transformation. *Nature Genetics*. 1994;6:273-281.
195. Jass JR. Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2:398-405.
196. Whitehall V, Leggett B. The serrated pathway of colorectal carcinogenesis. *Current Colorectal Cancer Reports*. 2009;5;75-83.
197. Muñoz A. Cáncer. Genes y nuevas terapias, ed. Hélice, capítulo 4; 1997.
198. Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell*. 1992;70:5-8.
199. Antequera F, Bird A. CpG islands. En *DNA methylation: molecular biology and biological significance*. Jost JP, Salud HP Eds. Basel, Birkhauser Verlag. 1993.
200. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1993;90:11995-11999.
201. Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene*. 2002;21:5380-5387.
202. Knowles M, Peter S. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press, 2005.
203. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*. 1998;53:3-4.
204. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006;6:107–116.

205. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:988-993.
206. Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner G, Weisenberger DJ, et al. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative ADN methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut*. 2006;55:1000-1006.
207. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38:787-793.
208. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS. Evaluation of Markers for CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer by a Large Population-Based Sample. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2007;9:315-314.
209. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular basis of colorectal cáncer: molecular origins of cáncer. *The new England Journal of Medicine*. 2009;25:2449.
210. Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskai RM. Mammalian ADN mismatch repair. *Annu Rev Genet*. 1999;33:533-564.
211. Chung DC, Rustgi AK. The Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003;138:560-570.
212. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencien, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:8698-8702.

213. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad.* 1998;95:6870-6875.
214. Menigatti M, Di Gregorio C, Borghi F, Sala E, Scarselli A, Pedroni M, et al. Methylation pattern of different regions of the MHL1 promoter and silencing of gene expression in hereditary and sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cáncer.* 2001;31:357-361.
215. Boland C, Thibodeau S, Hamilton S, Sidransky D, Eshleman J, Burt R, et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:5248-5257.
216. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29:201-212.
217. Perucho M. Microsatellite instability. The mutator that mutates the other mutator. *Nature medicine.* 1996;6:630-631.
218. Sherr C.J. Cancer cell cycles. *Science.* 1996;274:1672-1677.
219. Serrano M., Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature,* 1993;366:704-707.
220. Lizcano F. El ciclo celular. En: *Fundamento moleculares en medicina.* Fernando Lizcano Losada, editor Bogotá: El Manual Moderno y Universidad de La Sabana; 2005.

221. Tuveson DA, Weber BL, Herlyn M. BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies. *Cancer Cell*. 2003;4:95-98.
222. Gill M and Selebi JT. B-Raf and melanocytic neoplasia. *J Am Acad Dermatol*. 2005;24:165-183.
223. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Verloes A, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet*. 2006;38:294-296.
224. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, et al. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science*. 2006;311:1287-1290.
225. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:4393-4397.
226. Beach R, Chan AO, Wu TT, White JA, Morris JS, Lunagomez S, et al. BRAF Mutations in Aberrant Crypt Foci and Hyperplastic Polyposis. *Am J Pathol*. 2005;166:1069-1075.
227. Oikonomou E, Makrodouli E, Evangelidou M, Joyce T, Probert L, Pintzas A. BRAFV600E efficient transformation and induction of microsatellite instability versus KRASG12V induction of senescence markers in human colon cancer cells. *Neoplasia*. 2009;11:1116-1131.
228. Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, McCleary NJ, Ng K, Hollis D et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res*. 2012;1:890-900.

229. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF mutation in frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated Hmlh1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:191-195.
230. Shaukat A, Arain M, Thaygarajan B, Bond JH, Sawhney M. BRAF Mutation Associated with Interval Colorectal Cancers? *Digestive Diseases and sciences.* 2010;55:2352-2356.
231. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:5705-5712.
232. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009;101:715-721.
233. Liggett WH, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J. Clin. Oncol.* 1998;16:1197-1206.
234. Kanellou P, Zaravinos A, Zioga M, Spandidos DA. Deregulation of the tumour suppressor genes p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and p53 in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2009;160:1215-1221.
235. Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, et al. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res.* 1995;55:2995-2997.
236. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 1995;83:993-1000.

237. Burri N, Shaw P, Bouzourene H, Sordat I, Sordat B, Gillet M, et al. Methylation Silencing and Mutations of the p14ARF and p16INK4a Genes in Colon Cancer Lab Invest. 2001;81:217-229.
238. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancer. Nat Med. 1995;1:686-692.
239. Goto T, Mizukami H, Shirahata A, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, et al. Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. Anticancer Res. 2009;29:275-277.
240. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, Kanazawa H, Saito T, Matsuoka T, et al. Aberrant p16((INK4a)) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. J Cancer Res Clin Oncol. 2010;136:323-331.
241. Shen L, Catalano PJ, Benson AB III, O'Dwyer P, Hamilton SR, Issa JP. Association between DNA methylation and shortened survival in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-Fluorouracil-based chemotherapy. Clin Cancer Res 2007;13:6093–6098.
242. Maeda K, Kawakami K, Ishida Y, Ishiguro K, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. Oncol Rep. 2003;10:935–938.
243. Maestro ML, Vidaurreta M, Sanz-Casla MT, Rafael S, Veganzones S, Martínez A, et al. Role of the BRAF mutations in the microsatellite instability genetic pathway in sporadic colorectal cancer. Ann Surg Oncol. 2007;14:1229-1236.

244. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 1996;6:986–994.
245. Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y, Lee J, Ratovitski E, Sidransky D, et al. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2284-2288.
246. Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, Henrique R, Zhang Z, Hoque MO, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:97-107.
247. Schmiemann V, Bocking A, Kazimirek M, Onofre ASC, Gabbert HE, Kappes R, et al. Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clin Cancer Res*. 2005;11:7728-7734.
248. Jass JR, Sobin LH. *Histological Typing of Intestinal Tumours*: World Health Organization. 2^a edicion. New York, NY: Springer-Verlag NY Inc. 1989.
249. Grinnell RS. The grading and prognosis of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1950;3:641-652.
250. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006;314:268-274.
251. Boland CR, Shin SK, Goel A. Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer. *Yonsei Med J*. 2009;50:309-321.
252. Lindblom A. Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol*. 2001;13:63-69.

253. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;10;27:663-671.
254. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, et al. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;10;27:672-680.
255. Sharma SG, Gulley ML. BRAF mutation testing in colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:1225-1228.
256. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C, et al. Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients.. *Br J Cancer*. 2008;8;99:83-89.
257. Cerdán FJ, Díez M, Martínez S, Moreno G, Torres-Melero J, Balibrea JL. The results after extensive radical resection of locally advanced colorectal carcinoma. *Rev Esp Enferm Dig*. 1994;85:435-439.
258. Saridaki Z, Papadatos-Pastos D, Tzardi M, Mavroudis D, Bairaktari E, Arvanity H, et al. BRAF mutations, microsatellite instability status and cyclin D1 expression predict metastatic colorectal patients' outcome. *Br J Cancer*. 2010;102:1762-1768.
259. Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, Cullings HM, Takeda M, Kimura K, et al. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol*. 2004;15;22:4584-4594.

260. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. Cancer Res. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. 2005;65:6063-6069.
261. Tommasi S, Pinto R, Petriella D, Pilato B, Lacalamita R, Santini D, et al. Oncosuppressor methylation: a possible key role in colon metastatic progression.. J Cell Physiol. 2011;226:1934-1939.
262. Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, et al. Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. Clin Cancer Res. 2008;14:2560-2569.
263. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. Gut. 2009;58:90-96.
264. French AJ, Sargent DJ, Burgart LJ, Foster NR, Kabat BF, Goldberg R, et al. Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer. Clin Cancer Res. 2008;14:3408-3415.
265. Sanz-Casla MT, Maestro ML, Vidaurreta M, Maestro C, Arroyo M, Cerdán J. p16 gene methylation in colorectal tumors: correlation with clinicopathological features and prognostic value. Dig Dis. 2005;23:151-155.
266. Kumar K, Brim H, Giardiello F, Smoot DT, Nouraie M, Lee EL, et al..Distinct BRAF (V600E) and KRAS mutations in high microsatellite instability sporadic colorectal cancer in African Americans. Clin Cancer Res. 2009;15:1155-61.
267. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. Cancer Research. 2003;63:5209-5212.

268. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 2004;53:1137-1144.
269. Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, Tripp SR, Caan BJ, Slattery ML. Microsatellite instability and survival in rectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2009;20:1763-1768.
270. Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1307-1313.
271. Hawkins NJ, Bariol C, Ward RL. The serrated neoplasia pathway. *Pathology*. 2002;34:548-555.
272. Jass JR. Hyperplastic-like polyps as precursors of microsatellite-unstable colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2003;119:773-775.
273. Kim YH, Kakar S, Cun L, Deng G, Kim YS. Distinct CpG island methylation profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps. *Int J Cancer*. 2008;123:2587-2593.
274. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:1491–1501.
275. Vaughn CP, Wilson AR, Samowitz WS. Quantitative evaluation of CpG island methylation in hyperplastic polyps. *Mod Pathol*. 2010;23:151–151.
276. Tanaka N, Huttenhower C, Nosho K, Baba Y, Shima K, Quackenbush J, et al. Novel application of structural equation modeling to correlation structure analysis

- of CpG island methylation in colorectal cancer. *Am J Pathol.* 2010;177:2731-2740.
277. Miladi-Abdennadher I, Abdelmaksoud-Damak R, Ayadi L, Khabir A, Amouri A, Frikha F, et al. Expression of p16INK4a, alone or combined with p53, is predictive of better prognosis in colorectal adenocarcinoma in Tunisian patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2011;19:562-568.
278. Tie J, Gibbs P, Lipton L, Christie M, Jorissen RN, Burgess AW, et al. Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation. *Int J Cancer.* 2011;128:2075-2084.
279. Hinoue T, Weisenberger DJ, Pan F, Campan M, Kim M, Young J, et al. Analysis of the association between CIMP and BRAF in colorectal cancer by DNA methylation profiling. *PLoS One.* 2009;4:e8357.
280. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:18654-18659.
281. Tóth E, Serester O, Gallai M, Gurzu S, Jung I, Szentirmay Z. Molecular pathways and pathomorphology of colorectal cancers. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52:767-773.
282. Issa JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res.* 2008;14:5939-5940.
283. Issa JP, Shen L, Toyota M. CIMP, at last. *Gastroenterology.* 2005;129:1121-1124.
284. Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M. Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell.* 2003;4:121-131.
285. Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem.* 1996;377:675-684.

286. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14^{ARF} is independent of p16^{INK4a} methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 2000;60:129-133.
287. Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB. Association of k-ras with p16 methylation of the p16 gene in human colon cancer. *Gastroenterology.* 1999;116:1063-1071.
288. Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CpG islands and pericentromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancer. *In J Cancer.* 2001;91:205-212.
289. Winencke JK, Zheng S, Lafuente A, Lafuente MJ, Grudzen C, Wensch MR et al. Aberrant methylation of p16^{INK4a} in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1999;8:501-506.
290. Ogino S, Odze RD, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Laird PW et al. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:1175-1183.
291. Iacopetta B, Grieu F, Li W, Ruskiewicz A, Caruso M, Moore J, et al. APC gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2006;119:2272-2278.
292. Psofaki V, Kalogera C, Tzambouras N, Stephanou D, Tsianos E, Seferiadis K, et al. Promoter methylation status of hMLH1, MGMT, and CDKN2A/p16 in colorectal adenomas. *World J Gastroenterol.* 2010;16:3553-3560.

293. Wettergren Y, Odin E, Nilsson S, Carlsson G, Gustavsson B. p16INK4a gene promoter hypermethylation in mucosa as a prognostic factor for patients with colorectal cancer. *Mol Med*. 2008;14:412-421.
294. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9821-9826.
295. Kamiyama H, Noda H, Takata O, Suzuki K, Kawamura Y, Konishi F. Promoter hypermethylation of tumor related genes in peritoneal lavage and the prognosis of patients with colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 2009;100:69-74.
296. Brücher B, Geddert H, Langner C, Höfler H, Fink U, Siewert JR et al. Hypermethylation of hMLH1, HPP1, p14^{ARF}, p16^{INK4A} and APC in primary adenocarcinomas of the small bowel. *In. J. Cancer*. 2006;119:1298-1302.
297. Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2002;122:1376-1387.
298. Norrie MW, Hawkins NJ, Todd AV, Meagher AP, O'Connor TW, Ward RL. Inactivation of p16INK4a by CpG hypermethylation is not a frequent event in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2003;84:143-150.
299. Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol*. 2003;21:3729-3736.
300. Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1997;57:3370-3374.

301. Shima K, Nosho K, Baba Y, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, et al. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expresión in 902 colorectal cancers: Cohort study and literatura review. *Int J Cancer*. 2011;128:1080-1094.
302. Kawabuchi B, Moriyama S, Hironaka M, Fujii T, Koike M, Moriyama H, et al. p16 inactivation in small-sized lung adenocarcinoma: its association with poor prognosis. *Int J Cancer*. 1999;84:49-53.
303. Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, et al. Expression of tumor suppressor gene p16(INK4) products in primary gastric cancer. *Oncology*. 2000;58:126-136.
304. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987;238:163-170.
305. Xiong Z, Wu AH, Bender CM, Tsao JL, Blake C, Shibata D, et al. Mismatch repair deficiency and CpG island hypermethylation in sporadic colon adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:799-803.
306. Al-Moundhri MS, Al-Nabhani M, Tarantini L, Baccarelli A, Rusiecki JA. The prognostic significance of whole blood global and specific DNA methylation levels in gastric adenocarcinomas: PLoS One. 2010;23:e15585.
307. Ahn JB, Chung WB, Maeda O, Shin SJ, Kim HS, Chung HC, et al. DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. *Cancer*. 2011;117:1847-1854.
308. Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res*. 2008;68:8541-8546.

309. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology*. 2005;129:837-845.
310. Dahlin AM, Palmqvist R, Henriksson ML, Jacobsson M, Eklöf V, Rutegård J, et al. The role of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer prognosis depends on microsatellite instability screening status. *Clin Cancer Res*. 2010;16:1845-1855.
311. Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES, et al. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS One*. 2008;3:e3698.
312. Jover R, Nguyen TP, Pérez-Carbonell L, Zapater P, Payá A, Alenda C et al. 5-Fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2011;140:1174-1181.
313. Kim JH, Shin SH, Kwon HJ, Cho NY, Kang GH. Prognostic implications of CpG island hypermethylator phenotype in colorectal cancers. *Virchows Arch*. 2009;455:485-494.
314. Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2898-2903.
315. Lee S, Cho NY, Yoo EJ, Kim JH, Kang GH. CpG island methylator phenotype in colorectal cancers: comparison of the new and classic CpG island methylator phenotype marker panels. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:1657-1665.

316. Ogino S, Meyerhardt JA, Kawasaki T. CpG island methylation, response to combination chemotherapy, and patient survival in advanced microsatellite stable colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* 2007;450:529-537.
317. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol.* 1999;154:1805-1813.
318. Rawson JB, Mrkonjic M, Daftary D, Dicks E, Buchanan DD, Younghusband HB, et al. Promoter methylation of Wnt5a is associated with microsatellite instability and BRAF V600E mutation in two large populations of colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2011;104:1906-1912.
319. Ying J, Li H, Yu J, Ng KM, Poon FF, Wong SC, et al. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:55-61.
320. Benson AB 3rd, Schrag D, Somerfield MR, et al: American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:3408-3419.
321. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al: Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: Who benefits and by how much? *J Clin Oncol.* 2004;22:1797-1806.
322. Orta ML, Mateos S, Cortés F. DNA demethylation protects from cleavable complex stabilization and DNA strand breakage induced by the topoisomerase type I inhibitor camptothecin. *Mutagenesis.* 2009;24:237-44.

323. Ferracin M, Gafà R, Miotto E, Veronese A, Pultrone C, Sabbioni S, et al. The methylator phenotype in microsatellite stable colorectal cancers is characterized by a distinct gene expression profile. *J Pathol.* 2008;214:594-602.

ABREVIATURAS

- OMS: Organización Mundial de la Salud
- IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
- CCR: Cáncer Colorrectal
- INE: Instituto Nacional de Estadística
- APC: *Adenomatous Poliposis Coli*
- KRAS: Homólogo del oncogén del virus del sarcoma murino de Kirsten
- MSI: Inestabilidad de Microsatélites
- JPS: Síndrome de Poliposis Juvenil
- PJS: Síndrome de Peutz Jeghers
- CU: Colitis Ulcerosa
- CD: Enfermedad de Crohn
- ADN: Acido Desoxirribonucleico
- MSI-H: MSI de alto grado
- RR: Riesgo Relativo
- IC: Intervalo de Confianza
- ACO: Anticonceptivos Orales
- AINE: Antiinflamatorios no Esteroideos
- FAP: Poliposis Familiar Adenomatosa
- NCI: Instituto Nacional de Cáncer
- AFAP: Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada
- MYH: Homologo humano del gen mutY de E.Coli
- FCC: Cáncer Colorrectal Familiar
- HPS: Síndrome de Poliposis Hiperplasica
- MMR: Genes Reparadores del ADN

- HNPCC: Cáncer Colorrectal Hereditario No Poliposico
- MSS: Estabilidad de Microsatélites
- SNP: Polimorfismo de una base
- AJCC: Comité Americano de Cancer
- CAP: Colegio de Patólogos Americanos
- UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer
- TNM: Tumor-Ganglio-Metástasis
- SG: Supervivencia Global
- CRM: Margen Radial Circunferencial
- CEA: Antígeno Carcinoembrionario
- ASCO: Sociedad Americana de Oncología Clínica
- BRAF: Homologo B1 del oncogén virus del sarcoma murino v-raf
- MSI-L: MSI de bajo grado
- 5-FU: 5-Fluorouracilo
- DCC: Gen delecionado en CCR
- TS: Timidilato Sintasa
- CIN: Inestabilidad Cromosomica
- CpG: Citosina-Fosfato-Guanina
- CIMP: Fenotipo Metilador de Islas CpG
- DNMT: ADN-Metiltransferasas
- Kb: kilobase
- CDKN2A: Inhibidor 2A de quinasas dependientes de ciclina
- CIMP-H: CIMP de alto grado
- CIMP-L: CIMP de bajo grado

- PK: Proteín-Quinasas
- CDK: Quinasas Dependientes de Ciclinas
- RB: Retinoblastoma
- CDKI: Inhibidores de complejos ciclina- CDK
- KDa: KiloDalton
- EGFR: Receptor de crecimiento vascular epidermico
- MTS-1: *Major tumor suppressor*
- INK4: Inhibidor de quinasas 4a dependientes de ciclinas
- pb: Pares de base
- mRNA: Acido ribonucleico mensajero
- ARF: Fases de Lectura Alternativas
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- FRET: Transferencia de energía de resonancia fluorescente
- FAM: Fluoresceína
- qMSP: PCR cuantitativa específica de metilación.
- BHQ: *Black Hole Quencher*
- Ct: Ciclo umbral
- RML: Nivel relativo de metilación
- MYOD1: Gen de diferenciación miogénica
- DE: Desviación Estandar
- SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad
- HR: *Hazard Ratio* (razón de riesgos)
- IFL: Irinotecan/5-FU/Leucovorina

ANEXO

Estudio de las Alteraciones genéticas en pacientes intervenidos por carcinoma colorrectal.

El cáncer es un proceso del cual se desconocen sus causas y en los últimos años se están estudiando, desde la Biología Molecular, las implicaciones que las alteraciones genéticas pueden tener en su desarrollo.

Usted ha sido intervenido quirúrgicamente de patología colorrectal en el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Desearíamos que usted participe voluntariamente en un estudio que, de una forma sencilla, analizará en una pequeña muestra de tejido de la obtenida en el acto quirúrgico, distintos parámetros genéticos. Estas determinaciones no supondrán ninguna molestia añadida, en suma, no comporta riesgo alguno para usted. El material genético obtenido de la muestra solo se empleará para esta investigación.

Su participación en este estudio es voluntaria. Los datos resultantes de los análisis se almacenarán en un archivo seguro. Los profesionales sanitarios del centro tendrán acceso a los datos que consten en su historia clínica cuando sea necesario. El personal que acceda a los datos clínicos y genéticos quedará sujeto a la Ley de regulación del tratamiento automatizado de datos de carácter personal y la legislación sanitaria aplicable (Ley Orgánica 5/1992 de 29 de Octubre)

Habiendo comprendido lo anteriormente expuesto, doy mi consentimiento para participar en el estudio anteriormente indicado, en el que entiendo que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento.

Madrid a _____ de _____ -- _____

.....
.....
Firma del paciente o de la persona legalmente competente para dar la autorización.

.....
.....
Firma y número de colegiado del médico.